

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Induction de l'apoptose par l'hypoxie: rôle du facteur de transcription HIF-1

Georges, Marielle

*Award date:*  
2000

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Induction de l'apoptose par l'hypoxie :  
rôle du facteur de transcription HIF-1**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

**Marielle GEORGES**

**Juin 2000**



## **Induction de l'apoptose par l'hypoxie : Rôle du facteur de transcription HIF-1**

GEORGES Marielle

### Résumé

Le rôle de HIF-1 dans l'adaptation des cellules aux conditions d'hypoxie est bien décrit dans la littérature ; en effet, ce facteur de transcription possède comme gènes cibles l'érythropoïétine, le VEGF, des enzymes glycolytiques qui favorisent la survie de la cellule quand elle est soumise à une hypoxie. Cependant, l'hypoxie peut également induire la mort de la cellule par apoptose et paradoxalement HIF-1 serait également impliqué dans ce processus. Le but de ce mémoire était de mieux comprendre le rôle joué par HIF-1 dans l'apoptose induite par l'hypoxie.

Pour ce faire, nous avons mis au point des conditions expérimentales dans lesquelles l'hypoxie ou le TNF- $\alpha$  induisent l'apoptose chez les cellules COS-7 et les cellules L929. Ensuite, nous avons caractérisé cette apoptose par différents paramètres. De plus, nous avons étudié l'expression et la localisation subcellulaire de deux protéines pro-apoptotiques, Bax et p53. Nous avons ainsi mis en évidence la translocation de Bax dans les mitochondries et le noyau des cellules COS-7 en hypoxie ou incubées au TNF- $\alpha$ . Par contre, aucun changement d'expression ou de localisation de p53 ne fut observé. Dans une seconde partie, nous avons étudié le rôle de HIF-1 dans l'apoptose cellulaire. Pour cela, nous avons d'abord surexprimé HIF-1 par transfection transitoire puis induit ou inhibé l'activité de HIF-1 en utilisant des molécules chimiques. Les résultats des expériences montrent que HIF-1, lorsqu'il est activé, peut inhiber l'apoptose ainsi que la translocation de Bax induite par l'hypoxie ou le TNF- $\alpha$ . Ces résultats sont inattendus mais très intéressants car ils suggèrent un rôle protecteur de HIF-1.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

**Promoteur:** C. Michiels

Le moment est venu de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur J. Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Ensuite, je souhaiterais remercier ma promotrice, Carine Michiels, pour sa présence continue ainsi que sa bonne humeur quotidienne, ses conseils avisés et son aide qui était toujours très précieuse. Un grand merci pour tout. Je remercie également tous les membres de l'équipe HIF, qui eux non plus, n'ont pas hésité à donner de bons conseils et à apporter leur aide. Je pense surtout à Manu, Denis, Gaëtan, Isabelle R. et Dominique. Je ne voudrais pas oublier Jean-Pascal. Quant à Noëlle, elle m'a aidée à améliorer mes connaissances en microscopie confocale.

Puis, je n'oublie pas toutes les personnes du laboratoire toujours prêtes à répondre aux nombreuses questions que se pose un mémorant. Merci aussi à eux.

Je remercie surtout mes parents pour m'avoir donné l'occasion de réaliser des études qui me tenaient à coeur. Au cours de ces quatre années, ils n'ont pas hésité à m'apporter leur soutien quelles qu'étaient les circonstances.

Pour finir, je remercie amis et amies d'avoir supporté mes humeurs changeantes ces derniers temps. Je pense surtout à Bérengère, Laurence, Nicolas S., Cécile, Myriam, Caroline, Denis.....et plus particulièrement Nicolas N. Sans oublier les autres mémorants: Amélie, Patricia, Sébastien et Stéphanie.



<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. L'HYPOXIE .....</b>	<b>1</b>
I.1.1. Structure de HIF-1 .....	1
I.1.2. Gènes régulés par HIF-1 .....	2
A. L'érythropoïétine .....	2
B. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).....	3
C. Les enzymes glycolitiques.....	4
I.1.3. Régulation de HIF-1 .....	5
Voies d'activation de HIF-1 .....	5
1. Régulation transcriptionnelle .....	5
2. Régulation post-traductionnelle .....	6
Stabilité de la protéine .....	6
Phosphorylation de HIF-1 $\alpha$ .....	7
Translocation nucléaire.....	7
<b>I.2. LA MORT CELLULAIRE .....</b>	<b>9</b>
I.2.1. Définitions.....	9
I.2.2. Différences entre nécrose et apoptose .....	9
A. La nécrose .....	9
B. L'apoptose.....	10
<b>I.3. L'APOPTOSE.....</b>	<b>11</b>
I.3.1. Mécanisme de l'apoptose.....	12
I.3.2. Les substrats des caspases .....	14
I.3.3. La famille de Bcl-2 .....	14
I.3.4. Exemple d'apoptose contrôlée par les cytokines.....	15
I.3.5. Les interactions entre caspases et mitochondries .....	17
I.3.6. Le cytochrome c : un agent double pour la vie et la mort de la cellule.....	18
I.3.7. Mécanismes de translocation du cytochrome c .....	18
<b>I.4. L'HYPOXIE ET L'APOPTOSE.....</b>	<b>20</b>
<b>I.5. BUT DU TRAVAIL .....</b>	<b>23</b>
<b>II. MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>25</b>
<b>II.1. CULTURE CELLULAIRE .....</b>	<b>25</b>
II.1.1. Culture cellulaire des cellules COS-7.....	25
a) Caractéristiques de la lignée COS-7.....	25
b) Milieux de culture et solutions.....	25

c) Repiquage des cellules COS-7 .....	25
II.1.2. Culture cellulaire des cellules L929 .....	26
a) Caractéristiques des cellules L929 .....	26
b) Milieux de culture et solutions.....	26
c) Repiquage des cellules L929.....	26
<b>II.2. MISE AU REPOS DES CELLULES.....</b>	<b>27</b>
<b>II.3. INCUBATION SOUS HYPOXIE.....</b>	<b>28</b>
a) Matériel.....	28
b) Méthode.....	28
<b>II.4. MISE EN PRESENCE DES CELLULES DE TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>29</b>
a) Principe.....	29
b) Méthode.....	29
<b>II.5. COLORATION A L'ANNEXINE V .....</b>	<b>30</b>
a) Principe.....	30
b) Matériel .....	30
c) Méthode.....	31
<b>II.6. COLORATION TUNNEL .....</b>	<b>31</b>
a) Principe.....	31
b) Matériel.....	32
c) Méthode.....	32
<b>II.7. CELL DEATH DETECTION ELISA .....</b>	<b>33</b>
a) Principe.....	33
b) Matériel.....	34
c) Méthode.....	34
<b>II.8. DNA LADDER .....</b>	<b>36</b>
a) Principe.....	36
b) Matériel.....	36
c) Méthode.....	3
<b>II.9. TRANSFECTIONS .....</b>	<b>38</b>
a) Principe.....	38
b) Matériel.....	38
c) Méthode.....	38
<b>II.10. WESTERN BLOT.....</b>	<b>39</b>



II.10.1 Méthode de préparation des extraits protéiques.....	40
a) Matériel.....	40
b) Méthode.....	40
II.10.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	41
a) Méthode.....	41
II.10.3. Electrophorèse.....	41
a) Matériel.....	41
b) Méthode.....	43
II.10.4. Transfert.....	44
a) Matériel.....	44
b) Méthode.....	44
II.10.5. Traitement des membranes .....	45
a) Matériel.....	45
b) Méthode.....	46
II.10.6. Révélation du film .....	47
a) Matériel.....	47
b) Méthode.....	47
<b>II.11. IMMUNOFLUORESCENCE.....</b>	<b>48</b>
a) Matériel et solutions.....	48
b) Méthode.....	49
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>51</b>
<b>A. CARACTERISATION DE L'APOPTOSE.....</b>	<b>51</b>
1. Mise au point des conditions expérimentales.....	51
2. Caractérisation de l'apoptose .....	53
A. Fragmentation de l'ADN.....	53
1. Effet de l'hypoxie .....	53
a) Résultats.....	53
b) Discussion.....	54
2. Effet du TNF- $\alpha$ .....	54
a) Résultats.....	54
b) Discussion.....	54
B.Essais de quantification de l'apoptose .....	55
1. Coloration tunel.....	55
2. Coloration à l'annexine V .....	56
Résultats et discussion .....	57
1) Cellules en normoxie et en hypoxie.....	57
2) Cellules contrôles et cellules incubées avec du TNF- $\alpha$ .....	57
C.DNA ladder.....	58
Résultats et discussion.....	58
D.Implication des caspases.....	58
1. Effet de l'inhibiteur de caspases sur les cellules en hypoxie	59

Résultats et discussion .....	59
2. Effet de l'inhibiteur de caspases sur les cellules incubées en présence de TNF- $\alpha$ .....	59
E. Conclusion.....	60
3. Rôle de protéines pro-apoptotiques .....	61
A. La protéine Bax.....	61
1. Détection de la présence de la protéine Bax par Western Blot.....	62
Résultats et discussion.....	62
2. Localisation de la protéine Bax par immunofluorescence.....	63
a) Cellules en hypoxie et en normoxie.....	63
b) Cellules contrôles et cellules incubées en présence de TNF- $\alpha$ .....	64
B. La protéine p53.....	64
1. Détection de la présence de la protéine p53 par Western Blot.....	65
Résultats et discussion.....	65
2. Localisation de la protéine p53 par immunofluorescence.....	66
a) Cellules en hypoxie et en normoxie.....	66
b) Cellules contrôles et cellules incubées en présence de TNF- $\alpha$ .....	66
3. Conclusion.....	66
<b>B. RÔLE DE HIF-1.....</b>	<b>68</b>
1. Détection de la présence de HIF-1 $\alpha$ par Western Blot.....	68
Résultats et discussion.....	68
2. Surexpression de HIF-1 par transfection transitoire.....	69
Résultats1.....	70
Résultats2.....	71
1) Transfection puis incubation sous hypoxie.....	71
2) Transfection puis incubation en présence de TNF- $\alpha$ .....	71
3. Activation ou inhibition de HIF-1.....	71
Résultats et discussion.....	72
4. Expériences d'immunofluorescence.....	73
Résultats.....	74
1. Cellules en hypoxie et en normoxie.....	74
2. Cellules contrôles et cellules incubées en présence de TNF- $\alpha$ .....	74
Discussion.....	75
<b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>76</b>
<b>V. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>81</b>



## Liste des Abréviations

A : Adénine  
ABTS : 2.2'- azino di (3 ethylbenzothiozoline sulfanate)  
Ac : Anticorps  
ADN (ou DNA) : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine diphosphate  
Ahr : Aryl hydrocarbon receptor  
Ala : Alanine  
ANT : Adénine Nucléotide Translocator  
Apaf : Apoptosis protease-activating enzyme  
Arg : Arginine  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ARNT : Aryl Receptor Nuclear Translocator  
ATP : Adénosine triphosphate  
bHLH : basic Helix Loop Helix  
BSA : Bovine Serum Albumin  
bp : paire de base  
C : Cytosine  
CDKs : Cyclin-Dependent Kinases  
*C.elegans* : *Caenorhabditis elegans*  
DHG : DMEM High Glucose  
DISC : Death Inducing Signaling Complex  
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium  
DNase : endonucléase  
EDTA : éthylène diamine tétraacétate  
EPO : Erythropoïétine  
ERK1 : Extracellular Regulated Kinase 1  
ERK2 : Extracellular Regulated Kinase 2  
ES : cellules souches embryonnaires  
FADD : Fas-Associating protein with Death Domain  
FasL : Fas Ligand  
G : Guanine  
Gln : Glutamine  
GLUT-1 : glucose transporteur-1  
Gly : Glycine  
Hepes : hydroxyéthyl piperazine-éthane sulfonic acid  
HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1  
HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$   
HIF-1 $\beta$  : Hypoxia Inducible Factor-1 $\beta$   
HRE : Hypoxia Responsive Element  
Hsp 90 : Heat shock protein 90  
Hyp : Hypoxie  
ICE : Interleukine-1 $\beta$  Converting Enzyme  
IgG : Immunoglobuline G  
i-NOS : inducible Nitric Oxyde Synthase  
kD : kilo Dalton  
L : Lactacystine  
M : Molaire

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
MAPKK : MAPK Kinase  
mM : milliMolaire  
MTP : Mitochondrial permeability Transition Pore  
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NLS : Nuclear Localisation Site  
nM : nano Molaire  
Norm : Normoxie  
NT : Non Testé  
PARP : Poly ADP Ribose Polymérase  
PAS : Per Ahr/ARNT Sim  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PKC : Protéine Kinase C  
PM : Poids Moléculaire  
pro-IL-1 $\beta$  : pro-Interleukine-1 $\beta$   
PS : Phosphatidyl Sérine  
PTP : Permeability Transition Pore  
rpm : rotation par minute  
RT : Room Temperature  
SDS : dodécylsulfate de sodium  
SDS-PAGE : dodécylsulfate de sodium/Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
SV 40 : virus simien 40  
T : Thymine  
T75 : boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>  
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transférase  
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthylène diamine  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
TNF- $\beta$  : Tumor Necrosis Factor- $\beta$   
TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1  
TNFR2 : Tumor Necrosis Factor Receptor 2  
TRADD : TNF Receptor associating protein with death domain  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
Z-V-A-D-fmk : benzyl oxycarbonyl-val-ala-aspartyl-fluorométhylcétone  
 $\mu$ M : microMolaire



# **Introduction**



# I.INTRODUCTION

## I.1 L'hypoxie

Chez les mammifères, le développement des systèmes cardio-vasculaire, hématopoïétique et respiratoire procure un moyen de capturer l'oxygène venant de l'environnement et de le distribuer à chaque cellule. Celles-ci pourront alors l'utiliser comme substrat pour la phosphorylation oxydative et d'autres réactions chimiques.

Tous les organismes, depuis les bactéries jusqu'à l'être humain possèdent différents mécanismes pour maintenir l'homéostasie en oxygène qui est essentielle pour leur survie.

En conditions d'hypoxie, la cellule ne pourra plus produire les quantités suffisantes en ATP qui lui sont nécessaires pour maintenir les fonctions essentielles de la cellule.

L'hypoxie entraîne aussi chez la cellule un changement dans l'expression de ses gènes. En règle générale, une inhibition de la synthèse protéique est observée en condition hypoxique. Cependant, certaines protéines sont surexprimées de manière spécifique. Ces protéines sont notamment impliquées dans la réponse adaptatrice des cellules à l'hypoxie.

Bien que ces réponses adaptatrices à l'hypoxie peuvent se produire selon différents mécanismes moléculaires, le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) semble jouer un rôle important dans l'expression des gènes qui sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie en oxygène aux niveaux cellulaire et systémique.

### I.1.1 Structure de HIF-1

HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) est un hétérodimère constitué de deux sous-unités (Wang et Semenza, 1995) :

- HIF-1 $\alpha$  de masse moléculaire de 120-130 kD

---

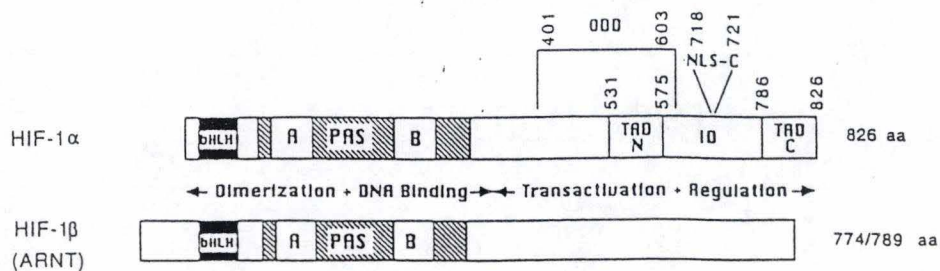


Figure I-1 : Structure des deux sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  (ARNT) du facteur HIF-1 (D'après Semenza, 1999).

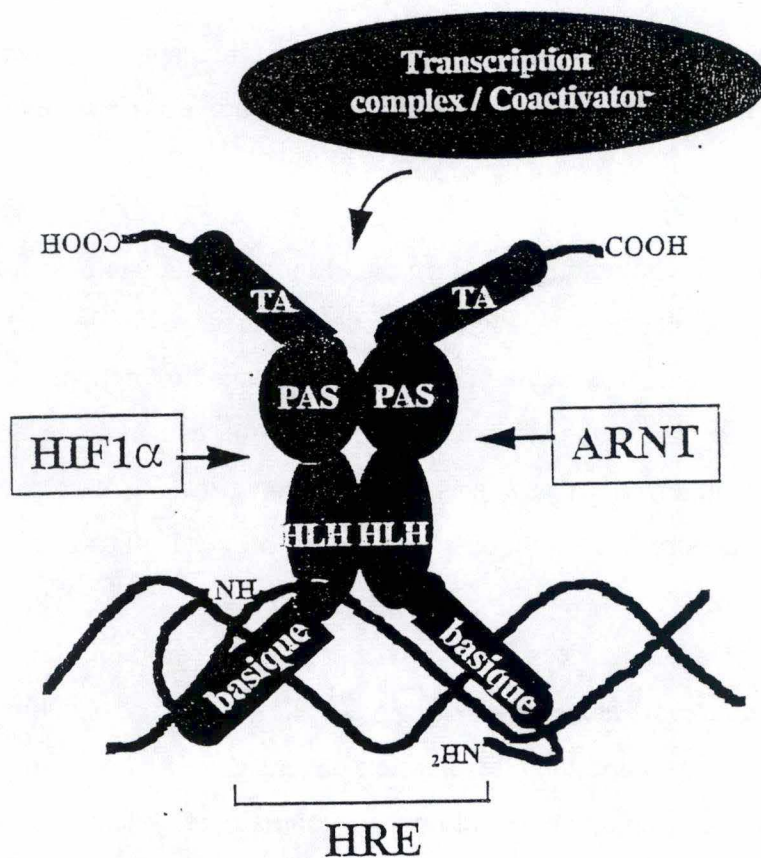


Figure I-2 : Structure du facteur de transcription HIF-1.



-HIF-1 $\beta$  de masse moléculaire de 91-94 kD aussi appelée ARNT (Aryl Receptor Nuclear Translocator).

Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des facteurs trans bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS (Per Ahr/ ARNT Sim) (Figure I-1).

Le domaine bHLH intervient non seulement dans la dimérisation des deux monomères mais il constitue aussi, grâce à la juxtaposition de résidus basiques, le domaine de liaison fonctionnel à l'ADN.

Le domaine PAS, quant à lui, offre un second mode de dimérisation. Mais il participe également à la liaison et à l'interaction avec d'autres protéines telles que, par exemple, la protéine chaperone Hsp 90.

Le domaine carboxy-terminal de HIF-1, riche en glutamines, contient le domaine de transactivation qui fait intervenir une interaction avec le co-activateur CBP/p300 (Figure I-2).

La séquence cis de HIF-1 ou HRE (hypoxia responsive element) correspond à la séquence nucléotidique : 5' (G,C/T-ACGTGC-G/T) 3'. Cette séquence consensus se situe dans le sillon majeur de la double hélice d'ADN des éléments régulateurs des gènes dont la transcription est augmentée sous hypoxie.

### I.1.2 Gènes régulés par HIF-1

HIF-1, lorsqu'il est activé, régule l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation des organismes supérieurs à des conditions hypoxiques. Ces conditions hypoxiques peuvent être engendrées, entre autre, par une altitude élevée, une anémie ou durant le développement. Ces gènes comprennent l'EPO, le VEGF, plusieurs enzymes glycolytiques, le glucose-transporteur-1, la NOS inductible (inducible nitric oxide synthase), l'hème oxygénase -1, la transferrine (Figures I-3 et I-4).

#### A.L'érythropoïétine (EPO)

L'oxygène, dans les mitochondries, joue le rôle d'accepteur terminal d'électrons et est essentiel à la survie de la plupart des organismes supérieurs.

Hypoxia-inducible gene	Species	Location	HIF-1 binding site	Function	Reference
erythropoietin	human	3'FS +3065/+3082	gcc TACGTGCTGT cta	+	Wang <i>et al.</i> , 1993b
erythropoietin	mouse	3'FS +359/+376	gcc TACGTGCTGC ctcg	+	Firth <i>et al.</i> , 1994
erythropoietin	human	5'FS -163/-180	tgc GACGTGCTG tggg	+	Semenza <i>et al.</i> , 1994
phosphofructokinase L	mouse	IVS1 +346/+361	ggcg TACGTGCTGC ag	+	Semenza <i>et al.</i> , 1994
aldolase A	human	5'FS -184/-201	ctcg GACGTGACTC ggac	+	Semenza <i>et al.</i> , 1996
aldolase A	human	IVS4 +124/+141	tctt CACGTGCGGG gacc	-	Semenza <i>et al.</i> , 1994
phosphoglycerate kinase 1	human	5'FS -173/-190	gtga GACGTGCGGC ttcc	+	Semenza <i>et al.</i> , 1994
phosphoglycerate kinase 1	human	5'FS -206/-189	gccg GACGTGACaa acgg	N.D.	Semenza <i>et al.</i> , 1996
phosphoglycerate kinase 1	mouse	5'FS -290/-307	ttgt CACGTcCTGC acga	+	Firth <i>et al.</i> , 1994
phosphoglycerate kinase 1	human	5'UT +30/+13	tgcc GACGTGCGCT ccgg	N.D.	Semenza <i>et al.</i> , 1994
enolase 1	human	5'FS -590/-607	gggc CACGTGCGGC gcc	-	Semenza <i>et al.</i> , 1994
enolase 1	human	5'FS -413/-396	gccg GACGTGCGGC ccca	-	Semenza <i>et al.</i> , 1996
enolase 1	human	5'FS -386/-369	tga TCGTGCGGG acTc	+	Semenza <i>et al.</i> , 1996
enolase 1	human	5'FS -368/-351	ggag TACGTGACGG agcc	+	Semenza <i>et al.</i> , 1996
lactate dehydrogenase A	mouse	5'FS -89/-72	ccta CACGTGGGTT cccg	+	Firth <i>et al.</i> , 1995
lactate dehydrogenase A	mouse	5'FS -62/-79	agcg GACGTGCGGG aacc	+	Firth <i>et al.</i> , 1995
glucose transporter 1	mouse	5'FS +273/+290	caca GCGTGCCGT ctga	+	Ebert <i>et al.</i> , 1995
vascular endothelial growth factor	human	5'FS -978/-961	tgc TACGTGGGCT ccaa	+	Liu <i>et al.</i> , 1995
vascular endothelial growth factor	rat	5'FS +61/+78	tgc TACGTGGGCT tcca	+	Levy <i>et al.</i> , 1995
inducible nitric oxide synthase	human	5'FS -229/-212	tgc TACGTGCTGC ctga	+	Melillo <i>et al.</i> , 1995
retrotransposon VL30	rat	5'FS -101/-113	agag TACGTGCTa	+	Estes <i>et al.</i> , 1995
heme oxygenase 1	mouse	5'FS +322/+339	agcg GACGTGCTGG cgtg	+	Lee <i>et al.</i> , 1997
heme oxygenase 1	mouse	5'FS +350/+333	agag GACGTGCCaC gcc	+	Lee <i>et al.</i> , 1997
transferrin	human	5'FS -201/-184	gaaa TACGTGCCCT ttgt	+	Rolfs <i>et al.</i> , 1997
transferrin	human	5'FS -185/-168	tgtg TACGTGCaGG aaag	+	Rolfs <i>et al.</i> , 1997

Tentative HIF-1 consensus DNA recognition site:

$\begin{matrix} T_{11} & A_{23} \\ G_{18} & G_7 \\ C_4 \end{matrix}$

$\begin{matrix} CGTG \\ G_4 & T_7 \\ A_2 & C_5 & C_5 & G_7 \end{matrix}$

$\begin{matrix} C_{18} & G_{12} & G_{14} & C_3 \\ T_1 & T_3 & T_7 \end{matrix}$

Figure I-3 : Liste (non exhaustive) de gènes dont la transcription est activée par HIF-1 (D'après Wenger & Gassman, 1997).

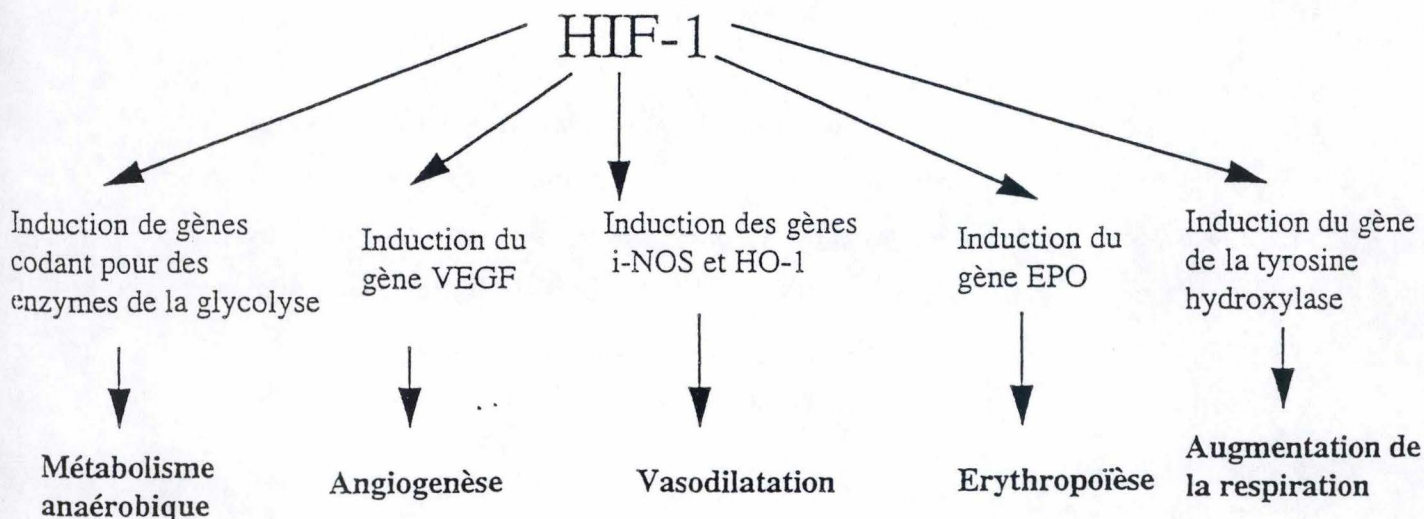


Figure I-4 : Principaux gènes induits et activés par HIF-1 et leur fonction (d'après Guillemin & Krasnow, 1997). (VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor ; i-NOS = inducible Nitric Oxide Synthase ; HO-1 = Hème oxygénase 1 ; EPO = érythropoïétine).



Chez les vertébrés, un des mécanismes par lequel ils s'adaptent aux conditions d'hypoxie est l'augmentation de la production des érythrocytes. Ce phénomène conduit à une augmentation de la capacité de transport de l'oxygène.

Cette réponse est médiée par l'érythropoïétine (EPO), une hormone glycoprotéique de 30kD. Lorsque les conditions d'hypoxie s'installent, la synthèse d'EPO augmente dans les reins et le foie. Cette induction est médiée par HIF-1. La synthèse d'érythropoïétine n'est donc pas stimulée par la concentration en hémoglobine mais bien par un appauvrissement de la teneur en oxygène.

Une fois libérée dans la circulation, l'EPO est transportée dans la moëlle osseuse où elle se lie à des récepteurs à EPO présents sur les cellules précurseurs d'érythrocytes. Une cascade « signalitique » est ensuite initiée, elle empêche l'apoptose de ces précurseurs d'érythrocytes et permet ainsi leur différenciation en érythrocytes matures.

Des analyses des régions régulatrices du gène d'EPO ont pu mettre en évidence la présence de la séquence HRE et ont démontré son implication dans la régulation de la transcription du gène codant pour l'EPO en conditions d'hypoxie. En effet, des sites hypersensibles à la DNase 1 ont été mis en évidence au niveau de la région activatrice située en position 3' du gène de l'EPO. Cette région 3' a été caractérisée comme étant un enhancer d'une longueur de 50 nucléotides qui possède trois sites de liaison pour 3 facteurs nucléaires dont HIF-1.

## B. VEGF (vascular endothelial growth factor)

Le VEGF est un facteur de croissance produit par de nombreux types cellulaires. C'est un facteur mitogénique puissant pour les cellules endothéliales chez qui il induit la prolifération. Il induit aussi la néo-vascularisation des nodules tumoraux.

La présence d'une séquence cis HRE est nécessaire mais pas suffisante pour qu'apparaisse l'induction transcriptionnelle du VEGF sous l'effet de l'hypoxie (Liu *et al*, 1995). En effet, cette séquence HRE s'intègre au sein d'un enhancer constitué d'autres éléments cis situés en 5' du gène. De plus, une augmentation de la stabilité de l'ARNm du VEGF est observée en hypoxie. Ce sont ces deux processus, induction de la transcription et augmentation de stabilité, qui expliquent la synthèse accrue de VEGF en hypoxie.

### C. Les enzymes glycolytiques

Une cellule, en conditions normales, utilisera les nutriments et l'oxygène disponibles pour fabriquer son énergie qui est essentielle pour assurer le bon déroulement de ses fonctions vitales.

Elle utilisera la glycolyse pour obtenir le pyruvate, ensuite le cycle de Krebs utilisera ce pyruvate et le transformera en NADH. La mitochondrie, quant à elle, utilisera ce NADH pour construire un gradient de protons suite au transfert des électrons sur les différents complexes de la chaîne respiratoire. Ces électrons seront finalement acceptés par l'oxygène pour être réduit en eau. L'énergie du gradient de protons est utilisée par l'ATP synthase pour régénérer l'ATP.

Par contre, sous hypoxie, la cellule ne peut plus réaliser que la glycolyse, qui représentera alors son seul moyen de produire de l'ATP. L'inconvénient pour la cellule est que ce procédé est beaucoup moins rentable que la phosphorylation oxydative. Pour compenser les pertes en ATP, la cellule n'a qu'une seule solution, celle d'augmenter son activité glycolytique.

Dans les cellules en conditions hypoxiques, HIF-1 active la transcription des gènes codant pour des enzymes spécifiques de la glycolyse ainsi que pour des protéines transporteurs de glucose. Tout ceci permet à la cellule d'augmenter son apport en glucose et son utilisation accrue via la glycolyse.

En conditions d'hypoxie, la transcription du gène codant pour le transporteur de glucose-1 est augmentée. Ceci permet le transport massif du glucose vers l'intérieur de la cellule.

En ce qui concerne les enzymes glycolytiques, on observe une augmentation de la quantité de l'aldolase A, de la phosphofructose kinase L, de la phosphoglycérate kinase 1, de la pyruvate kinase, suite à une augmentation de leur transcription.

Semenza *et al* (1996) ont démontré la liaison du facteur de transcription HIF au promoteur des gènes codant pour ces enzymes glycolytiques ; certains d'entre eux pouvant même contenir plusieurs HRE.



### I.1.3 Régulation de HIF

Jusqu'à présent, très peu de choses sont connues quant au mécanisme par lequel les cellules « sentent » la présence ou l'absence d'oxygène et quant à la voie de transduction du signal conduisant de ce senseur à l'activation de HIF-1.

Un modèle propose que le senseur à oxygène soit une hémoprotéine capable de fixer l'oxygène de manière réversible et de manière identique à l'hémoglobine. Dans ce modèle, le senseur à oxygène passerait d'un état conformationnel oxygéné inactif à un état déoxygéné actif. Suite à l'activation de ce senseur lors de la diminution de la pression partielle en oxygène, une cascade de transduction du signal serait initiée et conduirait à l'activation du facteur de transcription HIF-1.

Seule la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est régulée par la concentration cellulaire en oxygène. En effet, on n'observe pas de variation de la quantité de HIF-1 $\beta$  en condition hypoxique. De plus, cette protéine est constitutivement nucléaire. Lorsque l'hypoxie s'installe, on observe une augmentation de la quantité en protéine HIF-1 $\alpha$  ainsi que sa translocation dans le noyau où elle s'associe à la sous-unité HIF-1 $\beta$  pour former le facteur de transcription HIF-1. Celui-ci pourra alors se lier aux éléments cis HRE présents dans les promoteurs ou les enhancers des différents gènes cibles. Si la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est spécifique à HIF-1, la sous-unité HIF-1 $\beta$  ou ARNT peut aussi former des hétérodimères avec plusieurs autres protéines bHLH-PAS.

#### Voies d'activation de HIF-1 $\alpha$

HIF-1 $\alpha$  est régulé, sous hypoxie, à deux niveaux :

- au niveau transcriptionnel
- au niveau post-traductionnel.

#### 1. Régulation transcriptionnelle

Quand les cellules sont soumises à des conditions d'hypoxie, la quantité de protéine HIF-1 $\alpha$  augmente significativement tandis qu'aucun changement dans la quantité d'ARNm n'est observée dans la plupart des types cellulaires (Gradin *et al*, 1996, Huang *et al*, 1996).



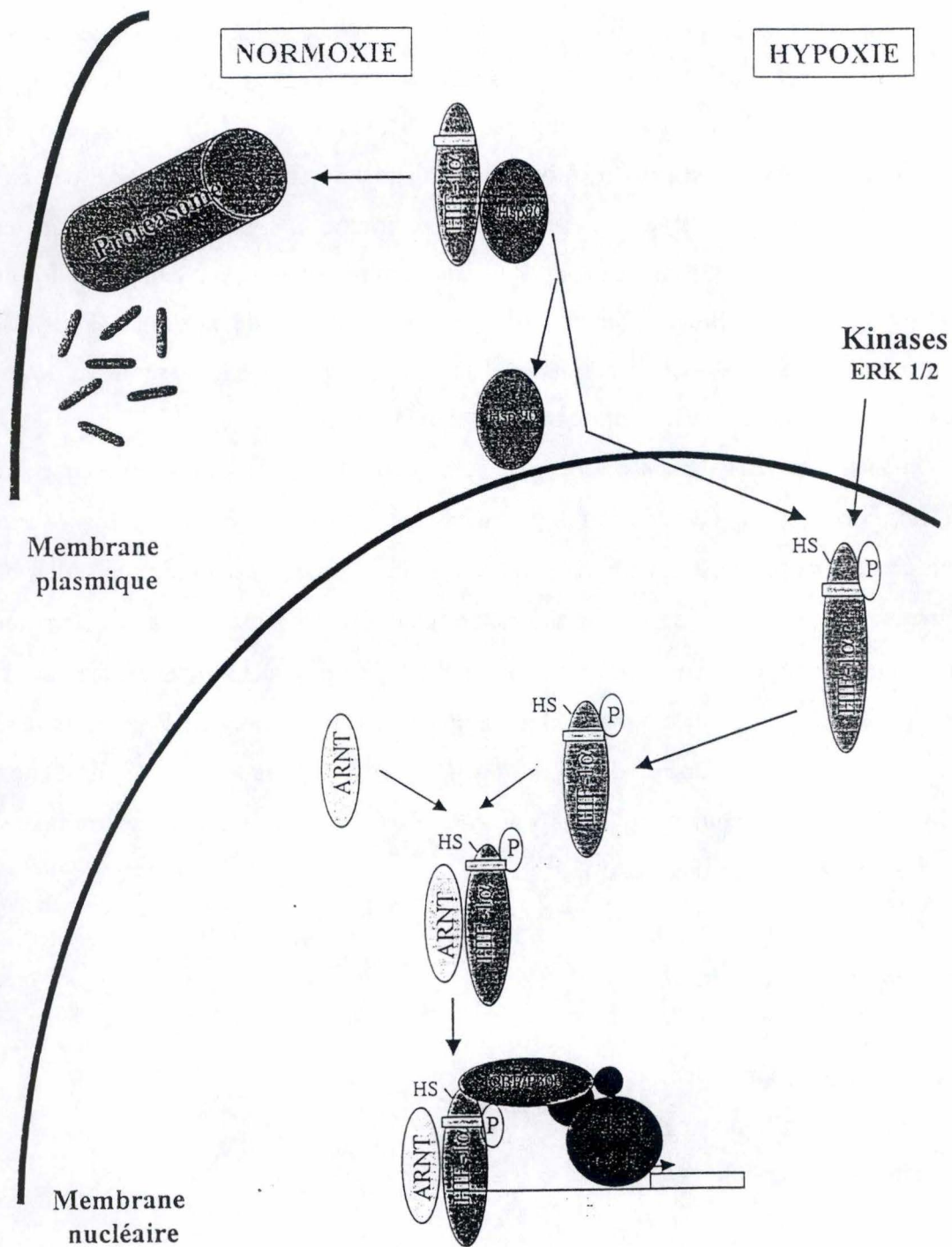


Figure I-5 : Régulation post-traductionnelle de HIF-1.

Cependant, d'autres expériences, menées sur des cellules hépatocytaires ont montré une augmentation de la quantité d'ARNm de HIF-1 $\alpha$  lors de l'hypoxie.

Minet *et al* (1999a) ont confirmé ces observations, c'est-à-dire que selon le type cellulaire, on observe ou pas une augmentation de la quantité en ARNm de HIF-1 $\alpha$  en condition d'hypoxie. En réalisant une dissection fonctionnelle du promoteur de HIF-1 $\alpha$ , ces auteurs ont délimité une séquence du promoteur qui, dans les cellules hépatocytaires, est responsable de l'augmentation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie. AP-1 serait le facteur de transcription responsable de cet effet. Cependant, dans les cellules endothéliales pour lesquelles on n'observe pas d'augmentation de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, cette région activatrice est éteinte par une région « répresseur » située plus en amont. Selon que cette région « répresseur » soit active ou inactive en fonction du type cellulaire, on aura donc absence ou présence de l'augmentation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie.

## 2. Régulation post-traductionnelle (Figure I-5)

### *-Stabilité de la protéine*

On observe une accumulation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  en hypoxie. Inversement, lorsque des cellules sont soumises à l'hypoxie puis sont réoxygénées, la protéine HIF-1 $\alpha$  disparaît dans un laps de temps très court, de l'ordre de cinq minutes correspondant au temps de demi-vie de cette protéine. Ces résultats suggèrent donc que la stabilité de cette protéine est augmentée en conditions hypoxiques.

De plus, chez des cellules dont l'activité du protéasome a été inhibée, une augmentation du taux de HIF-1 $\alpha$  a été observée et ceci dans des conditions normoxiques (Huang *et al*, 1998). Ces observations suggèrent que l'hypoxie entraîne une diminution de la dégradation de HIF-1 $\alpha$ .

Par ailleurs, on a pu observer que la partie carboxy-terminale de HIF-1 $\alpha$  médie la dégradation de la protéine, spécifiquement en conditions non hypoxiques (Jiang *et al*, 1997). D'autres analyses suggèrent que le domaine entre les aa 401 à 603 sont nécessaires et suffisants pour la régulation de la stabilité de la protéine. En effet,



fusionné à la protéine GAL4, ce domaine entraîne une digestion accélérée de cette protéine (Huang *et al*, 1998).

L'ensemble de ces travaux suggère que la protéine HIF-1 $\alpha$  est continuellement dégradée en normoxie mais devient stabilisée en hypoxie. La dégradation en normoxie de HIF-1 $\alpha$  implique son ubiquitination suivie de sa digestion par le protéasome 26 S (Huang *et al*, 1996, Kallio *et al*, 1999).

#### *-Phosphorylation de HIF-1 $\alpha$*

L'activité de liaison de HIF-1 à l'ADN dépend de son état de phosphorylation (Wang *et al*, 1995). Si on ajoute à une cellule un inhibiteur de protéine kinase, on n'observe pas d'induction de l'ARNm de EPO en hypoxie. De plus, si on traite des extraits nucléaires avec des phosphatases, on élimine la liaison de HIF-1 à l'ADN (Wang *et al*, 1995).

La phosphorylation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  semble être importante pour la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et pour l'activation du facteur de transcription HIF-1.

Les travaux de Minet *et al* (1999b) montrent une activation en hypoxie dans les cellules endothéliales de ERK1 et de ERK2, toutes deux des MAP kinases. En effet, ces deux enzymes deviennent phosphorylées et sont transloquées dans le noyau dans ces conditions. Des expériences utilisant des mutants dominants négatifs de ERK1 et de ERK2 ainsi qu'un inhibiteur de la MAPKK indiquent que ces MAPK, et principalement ERK1, sont impliquées dans l'activation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. De plus, on peut montrer que ERK1 activée par l'hypoxie est capable de phosphoryler directement le domaine carboxy-terminal de HIF-1 $\alpha$ . Cependant, ces MAPKs ne semblent pas impliquées dans les mécanismes de stabilisation de HIF-1 $\alpha$ .

Ces résultats indiquent que une ou des phosphorylations du domaine de transactivation de HIF-1 $\alpha$  par voie dépendante des MAPK sont nécessaires pour activer HIF-1 en hypoxie.

#### *-Translocation nucléaire*

Le taux de la protéine HIF-1 $\alpha$  est spécifiquement régulé en conditions d'hypoxie par un mécanisme qui empêche sa dégradation par le protéasome. HIF-1 $\alpha$  est ensuite transloquée dans le noyau où elle se dimérise avec ARNT pour former le complexe HIF-1.

ARNT est aussi connu pour être un translocateur nucléaire du récepteur Ahr (aryl hydrocarbon receptor). Ahr reconnaît les xénobiotiques, tels que la dioxine. Quand il est associé avec ARNT, il augmente la transcription de gènes impliqués dans la détoxification de ces xénobiotiques. Lorsque Ahr n'est pas associé à un ligand, il est présent dans le cytoplasme de la cellule en association avec la protéine chaperone Hsp90 (Heat shock protein) (Whitelaw *et al*, 1993). Lorsque Ahr se lie à un ligand, on observe la dissociation du complexe Ahr-Hsp90, Ahr migre alors dans le noyau où il dimérise avec ARNT pour former le facteur de transcription actif.

Bien que l'activité de HIF-1 $\alpha$  ne semble pas être régulée par la présence d'un ligand comme c'est le cas de Ahr, il existe des similarités entre ces deux facteurs. La plus grande étant leur dimérisation avec ARNT. De plus, Gradin *et al* (1996) ont démontré que HIF-1 $\alpha$  est aussi capable de se lier à Hsp90.

Minet *et al* (1999c) ont essayé de déterminer le rôle de Hsp90 dans la régulation de la translocation de HIF-1 $\alpha$  et dans l'activation de son activité transcriptionnelle.

Ils ont pu mettre en évidence qu'en normoxie, HIF-1 $\alpha$  est associée avec Hsp90 et que cette protéine chaperone interagit avec le domaine bHLH-PAS de HIF-1 $\alpha$ . En conditions d'hypoxie, Hsp90 se dissocie de HIF-1 $\alpha$ , entraînant sa translocation dans le noyau où elle pourra alors former le complexe HIF-1 avec ARNT. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que lorsque Hsp90 se dissocie de HIF-1 $\alpha$ , il démasque un motif NLS présent sur la protéine HIF-1 $\alpha$ , qui peut alors être transloquée dans le noyau.

L'activation du facteur HIF-1 est complexe et nécessite plusieurs étapes dont toutes ne sont pas encore connues, notamment celles concernant le senseur à oxygène. Cependant, on sait maintenant que son activation par l'hypoxie induit la transcription de gènes qui permettent à la cellule et aux tissus de s'adapter aux conditions d'hypoxie. HIF-1 est donc crucial dans la survie des cellules dans ces conditions.



## Necrosis

### Morphological features

- Loss of membrane integrity
- Begins with swelling of cytoplasm and mitochondria
- Ends with total cell lysis
- No vesicle formation, complete lysis
- Disintegration (swelling) of organelles

### Biochemical features

- Loss of regulation of ion homeostasis
- No energy requirement (passive process, also occurs at 4°C)
- Random digestion of DNA (smear of DNA after agarose gel electrophoresis)
- Postlytic DNA fragmentation (= late event of death)

### Physiological significance

- Affects groups of contiguous cells
- Evoked by non-physiological disturbances (complement attack, lytic viruses, hypothermia, hypoxia, ischemia, metabolic poisons)
- Phagocytosis by macrophages
- Significant inflammatory response

## Apoptosis

- Membrane blebbing, but no loss of integrity
- Aggregation of chromatin at the nuclear membrane
- Begins with shrinking of cytoplasm and condensation of nucleus
- Ends with fragmentation of cell into smaller bodies
- Formation of membrane bound vesicles (apoptotic bodies)
- Mitochondria become leaky due to pore formation involving proteins of the bcl-2 family.

- Tightly regulated process involving activation and enzymatic steps
- Energy (ATP)-dependent (active process, does not occur at 4°C)
- Non-random mono- and oligonucleosomal length fragmentation of DNA (Ladder pattern after agarose gel electrophoresis)
- Prelytic DNA fragmentation
- Release of various factors (cytochrome C, AIF) into cytoplasm by mitochondria
- Activation of caspase cascade
- Alterations in membrane asymmetry (i.e., translocation of phosphatidylserine from the cytoplasmic to the extracellular side of the membrane)

- Affects individual cells
- Induced by physiological stimuli (lack of growth factors, changes in hormonal environment)
- Phagocytosis by adjacent cells or macrophages
- No inflammatory response

Figure I-6 : Différences morphologiques et biochimiques entre l'apoptose et la nécrose (D'après Boehringer Mannheim).

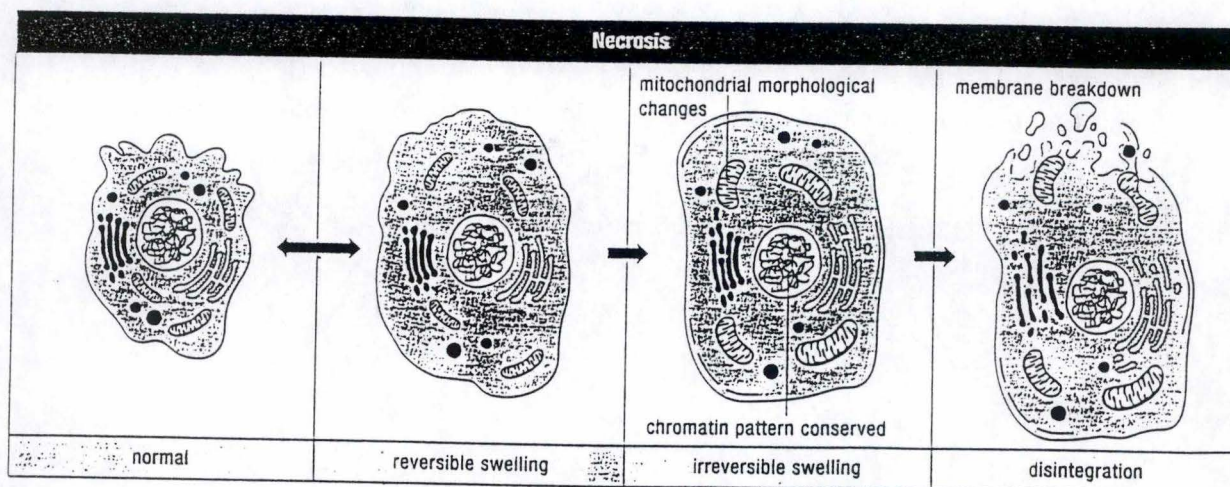


Figure I-7 : Caractéristiques morphologiques de la nécrose (D'après Boehringer Mannheim).

## I.2 La mort cellulaire

La mort cellulaire peut se dérouler selon deux mécanismes distincts, c'est-à-dire soit par nécrose soit par l'apoptose.

Afin de différencier ces deux termes, on peut tout d'abord donner une définition de chacun des deux termes et ensuite donner les caractéristiques qui les différencient.

### I.2.1 Définitions

La nécrose ou mort cellulaire « accidentelle » est le processus pathologique qui se produit lorsque les cellules sont exposées à un stress chimique ou physique.

L'apoptose ou mort cellulaire « normale » ou « programmée » est le processus physiologique par lequel les cellules non voulues ou inutiles sont éliminées pendant le développement ou d'autres processus biologiques normaux.

### I.2.2 Différences entre nécrose et apoptose

Il existe plusieurs différences morphologiques et biochimiques observables entre la nécrose et l'apoptose (Figure I-6).

#### A. La nécrose

La nécrose se produit quand les cellules sont exposées à des conditions physiques très extrêmes telles que par exemple l'hypothermie ou la mise en présence de molécules toxiques. Ceci peut donner naissance à des dommages de la membrane plasmique.

La nécrose commence lorsque la cellule devient incapable de maintenir son homéostasie. Ceci conduit à un influx d'eau et d'ions extracellulaires. Les organites intracellulaires, et plus particulièrement les mitochondries ainsi que l'entière de la cellule gonflent et leur membrane se rompt (Figure I-7). En réponse à la rupture de la membrane plasmique, le contenu cytoplasmique comprenant notamment les enzymes lysosomales est déversé dans le milieu extracellulaire (lyse cellulaire). C'est pourquoi,



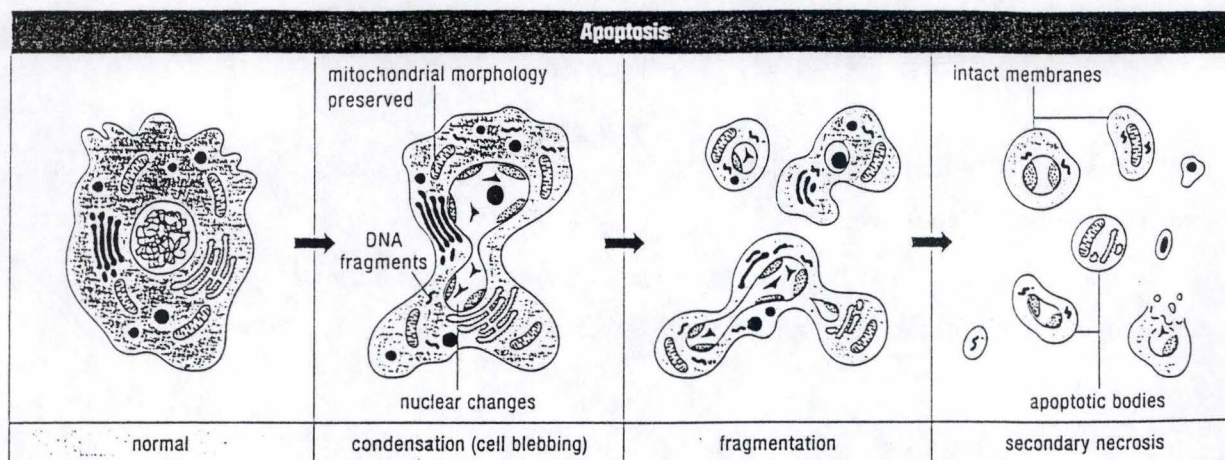


Figure I-8 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose  
(D'après Boehringer Mannheim).

in vivo, la mort cellulaire par nécrose est souvent associée à des dommages cellulaires étendus qui, de plus, entraînent aussi une réponse inflammatoire aigue.

#### A. L'apoptose.

L'apoptose, quant à elle, est un mode de mort cellulaire qui se produit dans des conditions physiologiques normales et la cellule est un participant actif dans sa propre mort. On peut parler de suicide cellulaire.

Les cellules en apoptose montrent des caractéristiques morphologiques et biochimiques particulières. Parmi ces caractéristiques, on retrouve l'aggrégation de la chromatine, la condensation nucléaire et cytoplasmique, la division du cytoplasme et du noyau en vésicules ou corps apoptotiques qui contiennent des ribosomes, des mitochondries morphologiquement intactes et du matériel nucléaire (Figure I-8).

En conditions in vivo, ces corps apoptotiques sont rapidement reconnus et phagocytés par des macrophages ou des cellules épithéliales adjacentes. Ce mécanisme, contrairement à la nécrose, n'entraîne pas de réponse inflammatoire.

En conditions in vitro, les corps apoptotiques aussi bien que les fragments cellulaires restant sont finalement lysés. Cette phase terminale de cette mort cellulaire « in vitro » a été nommée « seconde nécrose ».



MALADIES ASSOCIÉES À UN DÉRÈGLEMENT DE PROCESSUS APOPTOTIQUES			
Systèmes	Exemples	Apoptose	
		Suractivée	Inhibée
Maladies neuro- dégénératives	Alzheimer	+	
	SLA	+	
	Parkinson	+	
Désordres immunitaires	Maladies auto-immunes		+
	SIDA	+	
	Diabète	+	
	Thyroïdite	+	
Ischémie Reperfusion	Infarctus du myocarde	+	
	AVC	+	
Néoplasies	Lymphomes		+
	Astrocytomes		+
	Hépatomes		+
	Mélanomes		+
	autres		+
Divers	Vieillissement	+	
	Alopécie	+	

SLA: sclérose latérale amyotrophique.  
AVC: accident vasculaire cérébral.

Figure I-9 : Tableau des maladies associées à un dérèglement du processus apoptotique (D'après Mignon *et al*, 1998).

### I.3 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée joue un rôle déterminant au cours des processus physiologiques aussi différents que le développement, le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, le contrôle des tissus hormono-dépendants ou du renouvellement cellulaire. L'apoptose est également un facteur important dans la cinétique cellulaire des tumeurs, que ce soit pour leur croissance ou pour leur régression.

Beaucoup d'agents thérapeutiques anti-cancéreux exercent leurs effets en provoquant l'initiation de l'apoptose. D'un autre côté, l'apoptose contribue probablement à différents processus chroniques dégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et différents problèmes cardiaques (Figure I-9).

A la phase descriptive de la fin des années 1970, établissant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose (condensation du cytoplasme, formation de protubérances au niveau de la membrane plasmique, condensation de la chromatine nucléaire en périphérie du noyau et fragmentation internucléosomique de l'ADN conduisant à la formation de morceaux de 180 bp ou de multiples de 180 bp) a fait suite la phase moléculaire du début des années 1990, avec la caractérisation rapide des gènes impliqués dans la mort cellulaire très conservée à travers les espèces.

De nombreux signaux très différents, physiologiques comme pathologiques, intra comme extracellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher des processus apoptotiques.

Ainsi, la privation en facteurs de croissance, le traitement par des substances cytotoxiques ou des glucocorticoïdes, la protéine p53, le TNF $\alpha$  ou encore des agents agonistes de la voie de Fas peuvent induire l'apoptose dans de très nombreux types cellulaires.

En dépit de la diversité observée de ces multiples signaux inducteurs, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotiques montrent, de façon spectaculaire, des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires : tous ces signaux aboutissent à

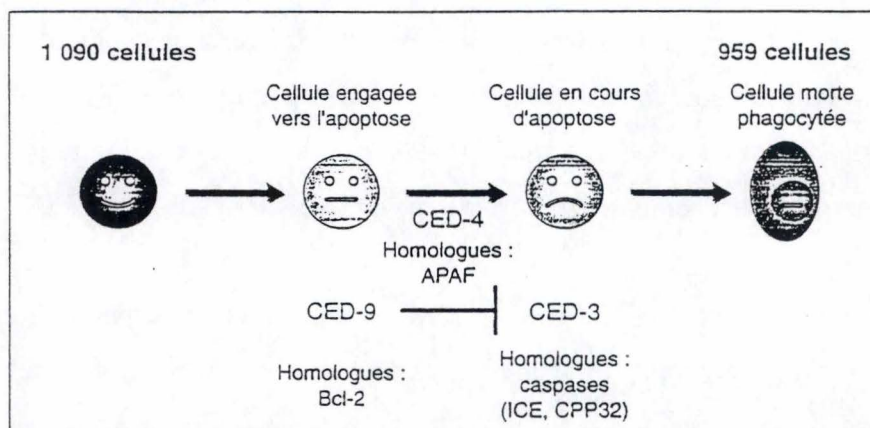


Figure I-10 : Apoptose au cours du développement chez *Caenorhabditis elegans* (D'après Mignon *et al*, 1998).



l'activation irréversible d'un tronc commun, constitué par des protéases à cystéine, appelées caspases, et orchestré par la mitochondrie.

### I.3.1 Mécanismes de l'apoptose

Le processus apoptotique peut être divisé en trois phases : une phase d'induction dont la nature dépend du signal spécifique induisant la mort, une phase effectrice durant laquelle l'exécuteur central est activé et la cellule commence à mourir et une phase de dégradation durant laquelle la cellule acquiert les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose proprement dite.

L'apoptose est un mécanisme essentiel au cours du développement des espèces, des plus simples aux plus complexes. Ce caractère remarquablement conservé au cours de l'évolution a permis, en particulier par l'étude du développement d'un petit nématode, *Caenorhabditis elegans*, d'identifier une famille de gènes codant pour des protéases à cystéine, désormais regroupées sous le terme générique de caspases, représentant les effecteurs de la mort cellulaire apoptotique.

Au cours du développement de *C.elegans*, 131 cellules disparaissent par un processus ayant toutes les caractéristiques de l'apoptose.

Trois gènes clés, *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* sont impliqués dans la mort ou la survie de ces 131 cellules (Figure I-10). L'analyse de mutants du gène *ced-9* a permis de définir son rôle : celui de prévenir l'apoptose des cellules devant survivre. Le clonage de *ced-9* a révélé une homologie de séquence de son produit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 connue chez l'homme et identifiée comme le membre fondateur d'une grande famille sans cesse croissante de protéines aux propriétés anti et pro -apoptotiques. Bcl-2, exprimée chez le nématode, ou *ced-9* exprimé dans des cellules n'exprimant pas Bcl-2, conservent leurs propriétés fournissant la preuve de l'analogie structurale et fonctionnelle de ces deux molécules dans la régulation des processus apoptotiques. *Ced-4* commence à dévoiler son rôle avec la description des premiers analogues humains : ils codent pour les Apaf (Apoptosis protease-activating factors) qui joueraient un rôle de chaperon et catalyseraient l'activation des caspases. C'est en fait *ced-3* qui

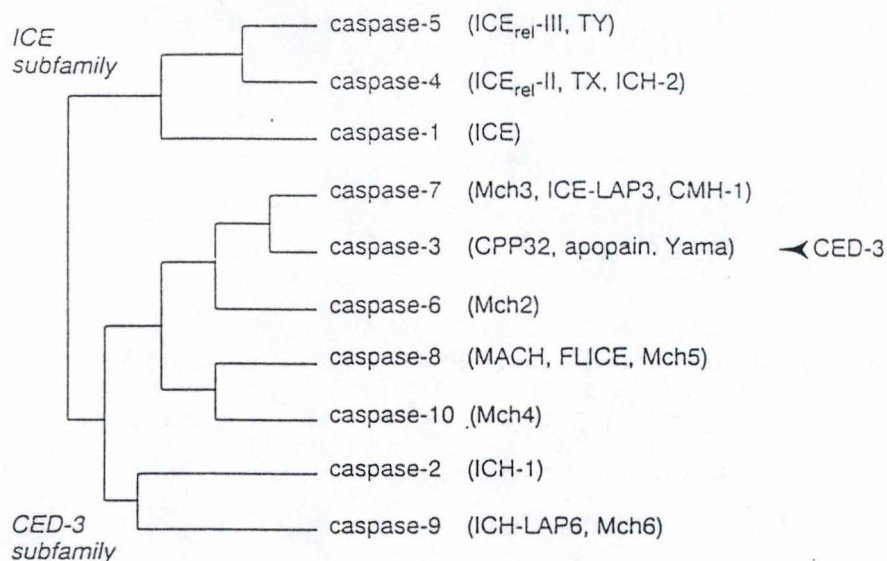


Figure I-11 : Les différentes caspases des familles ICE et CED-3  
(D'après Nicholson & Thornberry, 1997).

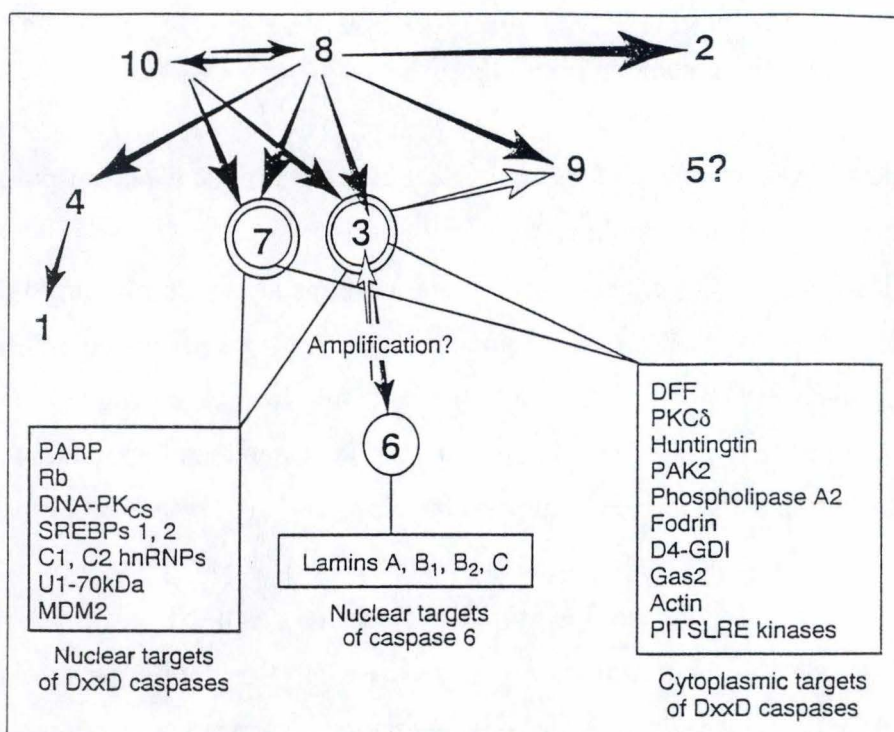


Figure I-12 : Cascade d'activation des caspases et nature de leurs différents substrats  
(D'après Villa et al, 1997).



joue le rôle principal dans la mort programmée des 131 cellules au cours du développement de *C. elegans*. Toutes les mutations réduisant ou abolissant complètement son activité entraînent, en effet, la survie de ces cellules, tandis que l'expression de ced-3 dans des cellules de mammifères induit leur apoptose. La détermination de la séquence de ced-3 a permis d'identifier un analogue de son produit chez les mammifères, la protéine ICE (interleukine-1 $\beta$  converting enzyme) antérieurement connue pour son activité protéasique impliquée dans la maturation de l'interleukine-1 $\beta$ . De plus, les mutations qui affectent l'activité de ced-3 touchent des régions homologues de ICE dont on sait qu'elles sont indispensables à son activité protéasique, suggérant qu'une activité protéasique est essentielle à la protéine ced-3 dans l'exécution du signal apoptotique.

A partir d'un organisme invertébré d'un millier de cellules, on a donc pu établir une modélisation des processus apoptotiques, identifiant deux grandes familles de gènes : des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, ced-9) qui règlent l'engagement définitif ou non vers la phase irréversible de mort qui est induite par les produits des gènes pro-apoptotiques, des protéases de la famille ICE/ced-3.

Si le mécanisme général est très conservé entre nématodes et mammifères, il s'est néanmoins enrichi chez les mammifères tant pour la famille de Bcl-2 (plus de 15 gènes connus), que pour celle des protéases de la famille ICE/ced-3 (Figure I-11 et I-12). Ces protéases possèdent toutes un site actif catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type Gln-Ala-Cys-Arg-Gly, leur conférant une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau de résidus aspartate. Les résidus entourant l'aspartate dans les substrats influencent la spécificité des différentes protéases.

La présence de résidus aspartate sur ces protéases elles-mêmes est une autre donnée structurale très importante. En effet, toutes les caspases existent sous forme de pro-enzymes inactives. L'activation de ces pro-caspases nécessite deux clivages sur des résidus aspartiques. Ces clivages enlèvent le pro-domaine amino-terminal et séparent la petite et la grande sous-unité catalytique. Une fois activées, les caspases peuvent donc s'auto-activer ou activer d'autres caspases.

Les caspases peuvent être divisées en deux groupes fonctionnels : les caspases initiatrices et les caspases exécutrices. Les caspases initiatrices sont responsables de

Cleaved protein	Proposed role	Predicted consequence of cleavage
PARP	DNA repair (stress)	Disable DNA repair
DNA-PKcs	DNA repair (ds)	Disable DNA repair
U1-70K snRNP	pre-mRNA splicing	Reduce productive transcripts
hnRNP-C	pre-mRNA splicing	Reduce productive transcripts
SREBP (+)	Sterol biosynthesis	Elevate sterols (engulfment)
D4-GDI	Sustain Rho-GTPase	Cytoskeletal disassembly
Huntingtin	(Unknown, essential)	Metabolic distress
DFF-45 site I (+)	DNA fragmentation	Dismantle genome
DFF-45 site II (+)		
DNA-RC C140	DNA replication	Halt DNA replication
PKC $\delta$ (+)	Cell-cycle progression	G2-M arrest
Rb	Cell-cycle progression	G1 arrest
HDM2/MDM2	p53 modulation	p53 nuclear entry
FAK	Regulate cell adhesion	Cell detachment/migration
NuMA	Nuclear structure integrity	Nuclear disassembly
Pro-caspase (+)		Protease activation
$\alpha$ -Fodrin	Cortical cytoskeleton	Disassembly
Actin	Cytoskeletal microfilaments	Disassembly
Gas2	Cytoskeletal microfilaments	Disassembly
Lamins	Nuclear envelope mesh	Disassembly

Figure I-13 : Substrats des caspases au cours de l'apoptose  
(D'après Nicholson & Thornberry, 1997).



l'activation des caspases exécutrices. Les caspases exécutrices, elles, clivent une série de protéines conduisant à l'apparition des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose et à la fragmentation de l'ADN.

En outre, certaines caspases sont impliquées dans les premières étapes de la transmission du signal des récepteurs contenant des domaines de mort (death domain). Ces récepteurs (TNFR, Fas, DR3), une fois activés recrutent à la membrane, un complexe, appelé DISC (death inducing signalling complex ) composé de molécules adaptatrices (FADD, TRADD), et de la caspase-8, proche évolutivement de ICE. La constitution de ce DISC est suivie du clivage protéolytique de la caspase-8 qui se débarrasse de sa portion amino-terminale et, devenant ainsi active, déclenche l'activation en cascade d'autres caspases et la phase ultime du processus apoptotique.

### I.3.2 Les substrats des caspases

A ce jour, une vingtaine de substrats de caspases ont été caractérisés parmi lesquels la pro-IL-1 $\beta$ , la PARP (poly ADP ribose polymérase), des lamines nucléaires, l'actine, la fodrine, la protéine kinase C (PKC) (Figure I-13).

Le clivage protéolytique a pour conséquence, soit l'activation de protéines impliquées dans le déroulement du processus apoptotique, soit l'inactivation de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire.

En revanche, le clivage protéique de chacun de ces substrats pris un à un ne semble pas avoir de conséquences majeures pour la cellule. Le clivage simultané de nombreuses protéines impliquées dans le maintien du cytosquelette de la cellule, la réparation de l'ADN, la séquestration de la DNase 1 (endonucléase associée à l'actine et impliquée dans la fragmentation de l'ADN), ou la synthèse des membranes doivent être les étapes nécessaires à l'accomplissement de la phase ultime de l'apoptose par les protéases activées.

### I.3.3 La famille de Bcl-2

Cette famille de protéines joue un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire et la survie cellulaire.



Quelques protéines comme Bax, Bid, Bad induisent la mort cellulaire tandis que d'autres comme Bcl-2 et Bcl-xL inhibent la mort cellulaire.

Les membres de cette famille peuvent former des homo- et des hétéro-dimères. Beaucoup de ces protéines sont ancrées dans les membranes mitochondriales par un domaine transmembranaire carboxy-terminal hydrophobe. Bcl-2 ou Bcl-xL peuvent empêcher la libération du cytochrome c provenant de la mitochondrie fournissant une explication possible quant à leur propriété de préserver la survie cellulaire.

Parallèlement, Bax est une protéine pro-apoptotique induisant la libération du cytochrome c. Cette libération induite par Bax peut être bloquée par Bcl-2 ou Bcl-xL mais pas par des inhibiteurs de caspases.

Dans les cellules vivantes, Bax réside dans le cytosol en tant que monomère inactif. Quand les cellules reçoivent un signal pro-apoptotique, Bax se transloque dans la mitochondrie et s'intègre dans la membrane sous forme de dimère. Cependant, le mécanisme par lequel Bax est transloqué est toujours inconnu. Il est possible que Bax subisse un changement conformationnel qui permette son insertion dans les membranes mitochondriales.

### I.3.4 Exemple d'apoptose contrôlée par les cytokines

Les cytokines sont une famille de protéines qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire en se liant à des récepteurs spécifiques se trouvant sur les cellules. Elles sont classées en trois familles :

- les facteurs de croissance
- la famille du TNF
- la famille des cytokines hélicales.

Dans une définition classique de l'apoptose, les cellules meurent par « suicide », les cellules programmées pour mourir le font de façon autonome. Cependant, l'identification de récepteurs comprenant un « death domain » ou domaine de mort qui régulent l'apoptose indique que celle-ci peut aussi être contrôlée par des facteurs externes dans certaines circonstances.

Le TNF, ainsi que FasL, appartenant à la famille du TNF, sont deux facteurs induisant la mort cellulaire. Ils se lient à des récepteurs et induisent l'apoptose, tuant les cellules dans les heures qui suivent.

La forme soluble et fonctionnelle du TNF, de même que FasL existe sous forme de trimère (Nagata, 1997). Fas, le récepteur de FasL, membre de la famille des récepteurs au TNF (TNFR 1 et TNFR 2) porte dans sa région extracellulaire 2 à 6 répétitions d'un domaine riche en cystéine qui a 25% d'homologie avec les autres membres de la même famille. Par contre, les régions cytoplasmiques montrent peu de similarité entre les différents membres, excepté pour Fas et TNFR1.

La présence d'un domaine homologue de plus ou moins 80 acides aminés dans la région cytoplasmique de Fas et TNFR1 suggère que cette région est responsable de la transduction du signal de mort. Ce domaine a donc reçu l'appellation de domaine de mort ou « death domain ».

Le domaine de mort a tendance à s'auto-aggréger et la structure tertiaire du domaine de mort de Fas montre que le domaine de mort est une protéine repliée faite de six hélices  $\alpha$  antiparallèles et amphipathiques. Beaucoup d'acides aminés chargés sont présents à sa surface et sont probablement responsables des interactions entre les domaines de mort.

Dans le cas du TNF, des analyses de diffraction aux rayons X du complexe formé de TNF $\beta$  et de son récepteur ont indiqué que le trimère TNF $\beta$  forme un complexe avec trois molécules de la région extracellulaire de son récepteur. Cette observation suggère que le TNF induit la « trimérisation » de son récepteur. La similitude de structure entre FasL et TNF suggère que FasL induit lui aussi la trimérisation de son récepteur c'est-à-dire de Fas.

Pour la suite de la transduction du signal, une nouvelle molécule a été identifiée, c'est la molécule FADD (Fas-associating protein with death domain) qui contient un domaine de mort à son extrémité carboxy-terminale. FADD est recruté lors de l'activation de Fas et se lie à celui-ci grâce aux interactions existantes entre les domaines de mort. Le domaine amino-terminal de FADD est responsable de la suite de la transduction du signal. Une molécule similaire, TRADD, se lie quant à elle, au TNFR1. Mais contrairement à FADD, aussi appelé MORT1, TRADD ne porte pas un domaine de mort « effecteur ». En fait, TRADD se lie à FADD via leurs domaines de mort. Ces



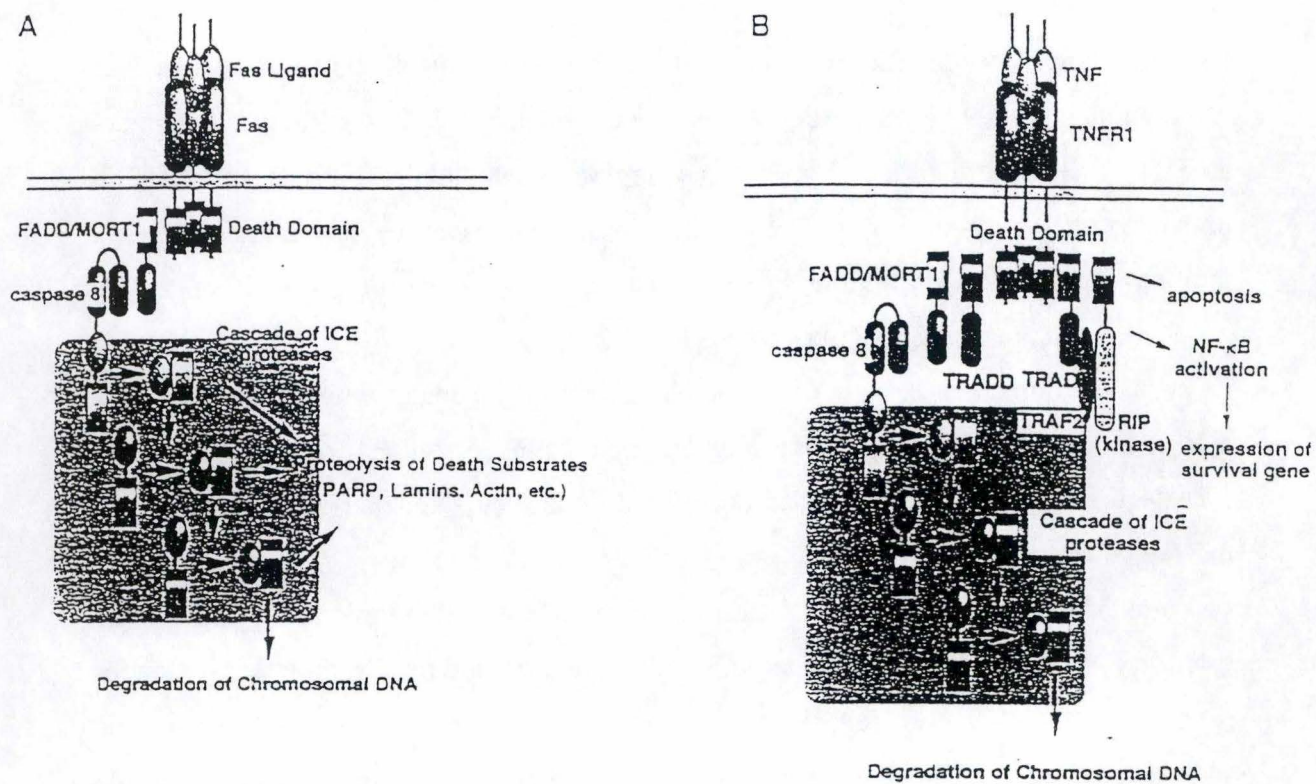


Figure I-14 : Modèles de l'apoptose médiée par les Death Factors

A : apoptose induite par Fas

B : apoptose induite par TNF- $\alpha$

(D'après Nagata, 1997).

observations suggèrent que Fas et TNFR utilisent FADD comme transducteur de signal commun (Figure I-14).

La caspase-8, possédant un ou deux domaines de mort dans sa région amino-terminale peut enfin interagir avec FADD. La caspase-8 ainsi activée peut alors cliver d'autres caspases et induire la cascade de caspases conduisant à l'apparition des caractéristiques spécifiques de l'apoptose.

### I.3.5 Les interactions entre caspases et mitochondries

La mitochondrie a pris une place considérable dans la description de la mort programmée et de ses mécanismes de régulation.

Elle semble, en effet, impliquée dans deux phases de l'apoptose, la phase de contrôle et la phase effectrice. L'analyse de mitochondries de cellules engagées en apoptose met en évidence une diminution de leur potentiel transmembranaire caractérisée par un gonflement de la mitochondrie et expliquée par l'ouverture de mégapores appelés mitochondrial permeability transition pores (MTP).

L'ouverture de ces pores semble finement régulée par Bcl-2 et ses partenaires, dont on signale l'ancrage dans la membrane externe des mitochondries, et la capacité de se comporter comme des canaux ioniques.

L'ouverture de ces pores semble responsable de la libération dans le cytoplasme de facteurs qui vont déclencher l'activation des caspases ou leur clivage protéolytique. Un de ces facteurs n'est autre que le cytochrome c.

En outre, l'ouverture des mégapores mitochondriales contribue à amplifier la phase effectrice de la mort de la cellule par le relargage dans le cytosol de radicaux libres et de calcium, elle contribue également à l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, le transport d'électrons et la phosphorylation oxydative sont interrompus et entraîne une diminution de la quantité d'ATP dans la cellule.

Ainsi, en participant à l'activation de caspases comme à la libération dans le cytosol de facteurs « apoptotiques » indépendants des caspases, la mitochondrie apparaît comme un acteur clé du processus apoptotique.



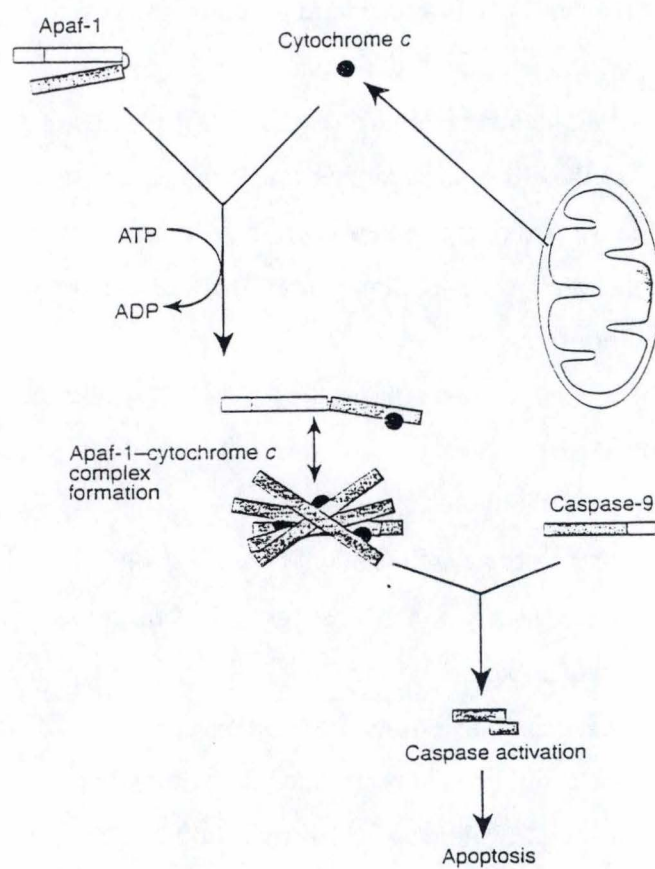


Figure I-15 : Activation mitochondriale-dépendante de la caspase 9  
(D'après Heiden & Thompson, 1999).

### I.3.6 Le cytochrome c : un agent double pour la vie et la mort de la cellule

Le cytochrome c est encodé par un gène nucléaire. Celui-ci, après transcription et traduction donne l'apo-cytochrome c, qui subit un import sélectif à travers la membrane externe mitochondriale. Une fois dans l'espace inter-membranaire, l'apo-cytochrome c acquiert un groupe hème entraînant un changement de conformation qui conduit au cytochrome c mature présent dans la mitochondrie.

Dans les cellules vivantes, le cytochrome c transporte les électrons du complexe respiratoire III au complexe IV, participant ainsi à la production intracellulaire d'ATP par phosphorylation oxydative.

Lorsque les cellules reçoivent un signal apoptotique, le cytochrome c traverse la membrane externe mitochondriale et s'accumule dans le cytosol où il joue le rôle de cofacteur dans l'activation des caspases (Figure I-15). La conséquence de la libération du cytochrome c dans le cytosol est une diminution du potentiel de membrane de la mitochondrie, la formation de radicaux libres due à une réduction incomplète de l'oxygène et une chute du niveau intracellulaire en ATP.

L'activation des caspases est seulement observée avec le cytochrome c mature et non avec l'apo-cytochrome c ne possédant pas le groupe hème.

Les régions responsables de la fonction pro-apoptotique du cytochrome c sont toujours inconnues.

### I.3.7 Mécanismes de translocation du cytochrome c

Comment le cytochrome c traverse-t-il la membrane externe mitochondriale ?

3 modèles ont été proposés pour répondre à cette question :



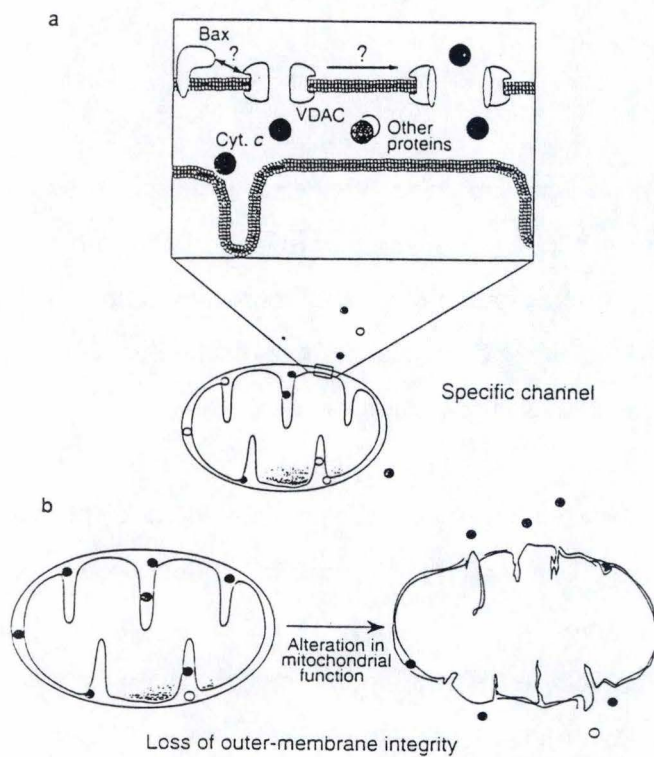


Figure I-16 : Modèles de translocation du cytochrome c à travers la membrane mitochondriale externe

a : selon un « channel » spécifique, le PTP

b : par la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe  
(D'après Heiden & Thompson, 1999).

A- Le relargage du cytochrome c pourrait être médié par l'ouverture de PTP. Le PTP est un complexe de plusieurs protéines formé aux sites de contact entre la membrane externe et interne de la mitochondrie. La composition du PTP reste à être définie mais comprend une protéine de la membrane interne, l'adénine nucléotide translocator (ANT) et une protéine de la membrane externe, la porine (VDAC) qui peut agir comme un « channel » permettant le passage de peptides de masse moléculaire inférieure à 1,5 kDa. L'ouverture de PTP entraîne une équilibration d'ions entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire, entraînant une diminution du potentiel transmembranaire et la rupture de la membrane externe mitochondriale conduisant ainsi à la libération passive du cytochrome c.

Cependant, certains travaux montrent que la libération du cytochrome c se passe juste avant ou en l'absence de la perte du potentiel de membrane, suggérant que la libération du cytochrome c est médiée par un autre mécanisme que l'ouverture du PTP. L'ouverture du PTP pourrait être le résultat de l'activation de caspases puisque l'utilisation d'inhibiteur de caspases empêche la diminution du potentiel de membrane mais pas la libération du cytochrome c.

B- Le second modèle propose que la libération du cytochrome c soit entraînée par un gonflement de la mitochondrie et la rupture consécutive de la membrane mitochondriale sans que la diminution du potentiel de membrane n'ait lieu.

C- Le dernier modèle propose, quant à lui, que la libération du cytochrome c impliquerait un channel spécifique de la membrane externe mitochondriale. Bax est un candidat pour la formation d'un tel tunnel. Bax, membre de la famille pro-apoptotique de Bcl-2 peut former des canaux à ions dans des bicouches lipidiques synthétiques. Cependant, ce tunnel paraît être trop petit pour permettre le passage de protéines (Figure I-16).



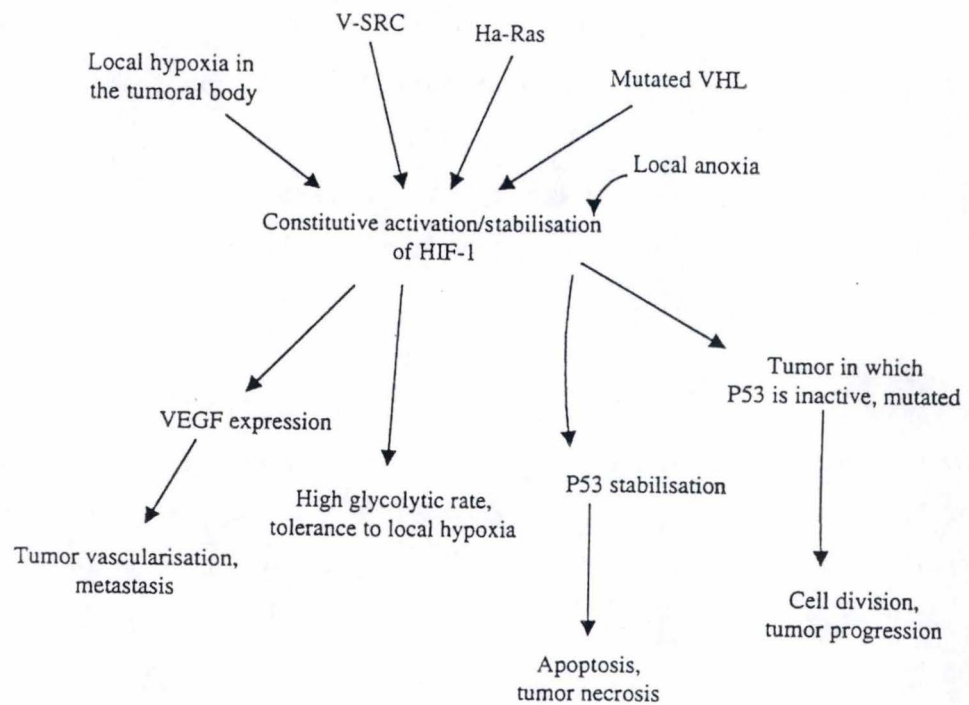


Figure I-17 : Implication de HIF-1 dans la progression des tumeurs (D'après Minet *et al*, 1999d).

## I.4 L'hypoxie et l'apoptose

HIF-1 est un régulateur majeur de l'adaptation des cellules aux conditions hypoxiques. Il est ainsi impliqué dans la croissance des nodules tumoraux. En effet, lorsqu'une tumeur croît, les cellules situées en son centre deviennent hypoxiques. Elles induisent alors, via l'activation de HIF-1, la synthèse et la libération de VEGF. Cette protéine est un facteur angiogénique puissant qui attire les cellules endothéliales et induit leur prolifération, ce qui conduira à la formation nouveaux capillaires qui vont acheminer le sang au centre de la tumeur, permettre son oxygénation et donc sa croissance future. De plus, HIF-1, en conditions hypoxiques, induit une augmentation de l'activité glycolytique des cellules, ce qui permettra une croissance plus rapide de la tumeur (Figure I-17).

Les travaux de Ryan *et al* (1998) montrent que si des cellules souches embryonnaires exprimant HIF-1 $\alpha$  sont injectées à des souris, elles forment des tumeurs. Cependant, on observe une progression plus lente de la tumeur si des cellules souches embryonnaires délétées pour HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  -/-) sont injectées. Ces résultats sont explicables par le fait que le facteur de transcription HIF-1 induit VEGF et donc la vascularisation qui permettra à la tumeur de croître, comme nous l'avons vu ci-dessus. Si HIF-1 n'est plus actif, le VEGF ne sera pas induit, ni la croissance des capillaires.

Ces résultats ne sont cependant pas toujours observés. En effet, en travaillant sur des souris auxquelles on injecte des cellules souches embryonnaires délétées en HIF-1, Carmeliet *et al* (1998) observent une croissance plus rapide des tumeurs par rapport à des cellules souches HIF-1 $\alpha$  +/+. Ceci est probablement dû au fait qu'on observe en parallèle une augmentation du nombre de cellules en apoptose dans les différentes couches de la tumeur. Il faut cependant noter que dans ce cas, les tumeurs qui n'expriment pas HIF-1 $\alpha$  restent petites et ne réalisent pas de métastases, ce qui indique que HIF-1 est indispensable pour la progression rapide des tumeurs.

Le facteur de transcription HIF-1 est nécessaire pour maintenir la prolifération cellulaire en conditions d'hypoxie chez de nombreux types cellulaires mais aussi chez des cellules souches embryonnaires. Cependant, les résultats indiquent que HIF-1 est aussi impliqué



dans l'apoptose de ces cellules souches embryonnaires (ES). Quel pourrait être le rôle de HIF-1 dans l'induction de l'apoptose ?

Chez les cellules Hepac7, une augmentation de la présence de p53 est observée en parallèle avec l'augmentation en HIF-1 $\alpha$ . Par contre, chez des cellules Hepac4 qui sont déficientes en HIF-1 $\alpha$ , on n'observe plus l'augmentation de la quantité de la protéine p53 en hypoxie (An *et al*, 1998). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré une interaction entre HIF-1 $\alpha$  et p53 et ce serait cette interaction qui serait responsable de la stabilisation de p53 en hypoxie.

La protéine p53 est une protéine dégradée par la voie du protéasome. En conditions d'hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est stabilisée et est capable d'interagir directement ou indirectement avec p53 et ainsi d'en prévenir sa dégradation par le protéasome. Cette interaction semble avoir deux conséquences : en premier lieu, la stabilisation et l'augmentation de la quantité de p53 dans la cellule. Deuxièmement, cela induirait l'inactivation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Cependant, ce phénomène n'apparaît seulement que pour des concentrations cellulaires très élevées en p53 (Blagosklonny *et al*, 1998).

HIF-1 et p53 sont capables d'interagir avec le coactivateur p300 mais ils interagissent à des endroits différents de celui-ci, ce qui suggère qu'ils peuvent se lier à p300 simultanément. Ceci pourrait expliquer comment l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est réprimée par p53. En effet, chez des cellules PC3M surexprimant HIF-1 $\alpha$ , ainsi que p300 et une forme mutée de p53 incapable de lier p300, aucune inhibition de la transactivation de HIF-1 n'a été observée (Blagosklonny *et al*, 1998). Ces résultats suggèrent que l'activité de HIF-1 est inhibée par la liaison de p53 sur p300.

Les conséquences des relations existant entre p53 et HIF-1 sont complexes et leurs implications dans le phénomène de la progression des tumeurs ou dans l'induction de l'apoptose restent largement mal comprises, car selon le modèle cellulaire utilisé les résultats observés peuvent être diamétralement opposés.

Remarque : quelques mots sur p53

p53 est un facteur de transcription connu pour sa capacité de supprimer le développement du cancer en partie en induisant la mort des cellules qui montrent des

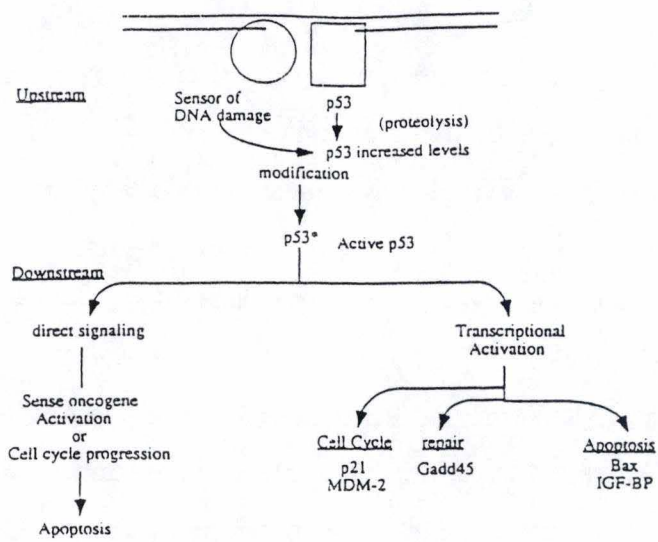


Figure I-18 : Activation et rôles de p53  
(D'après Levine, 1997).



dommages à l'ADN. Plus ou moins 50% des cancers montrent une mutation chez p53 qui inhibe son efficacité en tant que suppresseur de tumeur.

Chez des cellules normales, une fonction importante de p53 est de causer l'arrêt de la progression du cycle cellulaire lorsque les cellules montrent des dommages à l'ADN. L'arrêt de la prolifération cellulaire en réponse à des dommages de l'ADN nécessite la présence de cAbl, une protéine nucléaire à fonction tyrosine kinase qui se lie à p53 et la phosphoryle. On observe aussi une augmentation de la stabilité de la protéine p53. Lorsque p53 est activée par phosphorylation en réponse à des dommages de l'ADN, elle stimule la transcription de quelques gènes dont p21, Bax, la cycline G et GADD45. GADD45 qui se lie à PCNA, est trouvé dans des cellules normales sous forme de multiprotéines et forment des complexes avec p21 et Cycline/CDKS. Ces complexes sont impliqués dans la réparation de l'ADN et inhibent la réplication de l'ADN tant que celui-ci n'est pas réparé.

L'induction de Bax par p53 induit l'apoptose des cellules si l'ADN n'est pas réparé (Figure I-18).

## I.5 Objectif

Si le rôle de HIF-1 dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie est bien décrit, son implication dans le processus d'apoptose reste encore largement incompris. C'est en effet une observation fortuite de Carmeliet *et al* (1998) qui a initié les recherches dans ce domaine. Ils ont en effet montré que des tumeurs de cellules souches embryonnaires HIF-1 $\alpha$  -/- croissent mieux que les contrôles HIF-1 $\alpha$  +/+ et ce, parce que leur taux d'apoptose est diminué. Le mécanisme par lequel HIF-1 favorise l'apoptose pourrait impliquer la stabilisation de p53, protéine pro-apoptotique, par HIF-1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie (An *et al*, 1998).

Différentes questions sont soulevées par ces résultats :

- Est-ce que HIF-1 contrôle l'apoptose dans d'autres types cellulaires que les cellules souches embryonnaires ?
- Est-ce qu'il module l'apoptose induite par l'hypoxie mais aussi par d'autres stimuli ?
- Et surtout est-ce que la stabilisation de p53 par HIF-1 $\alpha$  est le seul mécanisme par lequel HIF-1 module l'apoptose ?

Afin de tenter de répondre à ces questions, nous avons, dans un premier temps, mis au point des conditions expérimentales dans lesquelles l'hypoxie peut induire le processus d'apoptose. En parallèle, l'effet du TNF- $\alpha$  a été étudié : le TNF- $\alpha$  est en effet une cytokine bien connue pour induire l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Nagata, 1997). Nous avons choisi d'étudier l'effet de l'hypoxie et du TNF- $\alpha$  principalement sur deux types cellulaires : les cellules COS-7 parce que l'effet de l'hypoxie sur l'activation de HIF-1 y est bien décrit (Mottet, 1999) et les cellules L929 car la voie de transduction du signal induite par le TNF- $\alpha$  y est bien connue (Goossens *et al*, 2000).

L'apoptose induite par l'hypoxie et le TNF- $\alpha$  sera caractérisée en utilisant différents critères : fragmentation de l'ADN, changements membranaires et implication des



caspases. De plus, l'expression et la localisation subcellulaire de deux protéines pro-apoptotiques, Bax et p53, seront étudiées.

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'implication du facteur de transcription HIF-1 dans l'induction de l'apoptose par l'hypoxie ou le TNF- $\alpha$ . Pour ce faire, deux approches seront envisagées : la surexpression de HIF-1 en transfection transitoire et l'activation ou l'inhibition de HIF-1 à l'aide de molécules chimiques.

Les résultats de ces différentes expériences devraient permettre de mieux comprendre comment l'hypoxie induit l'apoptose et comment HIF-1 peut moduler cette apoptose.

**Matériel**  
**et**  
**Méthodes**



## II. Matériel et méthodes

### II.1 Culture cellulaire

#### II.1.1 Culture des cellules COS-7

##### a) Caractéristiques de la lignée COS-7

Les cellules COS-7 sont des cellules de rein de singe (*Ceropithecus oethiops*) transformées par le virus SV40.

##### b) Milieux de culture et solutions

- Milieu DMEM + sérum : milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)  
enrichi par 10 % de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, Grande Bretagne).
- Hepes 20 mM pH 7,4 (Janssens Chimica, Beerse, Belgique).
- Antibiotiques (optionnel) :
  - \* Pénicilline G : 50 U/ml (Sigma, St Louis, USA).
  - \* Amphotéricine-B : 5 ng/ml (Sigma, St Louis, USA).
- Trypsine-EDTA : solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck.

##### c) Repiquage des cellules COS-7

Les COS-7 sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75, Costar, Corning, New York, USA). Lorsqu'elles sont confluentes, c'est-à-dire quand elles forment une monocouche, on les repique en 2 ou en 4.

Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage ne contenant pas de sérum. Ensuite, les cellules sont détachées

au moyen de 1 ml de + EDTA que l'on laisse agir quelques minutes. Lorsque les cellules se détachent, la réaction est arrêtée au moyen de 9 ml de DMEM + 10 % sérum. L'évolution du détachement cellulaire est suivie au microscope optique (Zeiss, Allemagne). Ensuite, la suspension cellulaire est transvasée dans un tube stérile de 10 ml (Sterilin, Feltham, Grande Bretagne) et centrifugé pendant 5 minutes à 1000 rpm (Centrifugeuse Universal, Hettich, Allemagne).

Le surnageant est décanté et le culot de cellules est resuspendu dans 5 ml de milieu DMEM + 10 % sérum et les cellules sont réparties après comptage à la densité désirée dans les boîtes de culture ou les plaques multi-puits. Les boîtes sont alors placées dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO<sub>2</sub>). Lorsqu'elles sont à nouveau confluentes, elles sont repiquées selon le même procédé.

### II.1.2 Culture des cellules L929

#### a) Caractéristiques de la lignée L929

Les cellules L929 sont des fibroblastes de sarcome murin.

#### b) Milieux de culture et solutions

- Milieu DHG + sérum : milieu DHG (DMEM high glucose) enrichi par 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Trypsine : solution de trypsine à 0,5 g/l.

#### c) Repiquage des cellules L929

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75, Costar, Corning, New York, USA). Lorsqu'elles arrivent à confluence, c'est-à-dire quand elles forment une monocouche cellulaire, on les repique dans deux ou quatre boîtes T75.



Les milieux utilisés sont préchauffés à 37°C. L'ancien milieu est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml d'un milieu de rinçage. Après deux minutes, ce milieu est éliminé de la boîte de culture et 1,5 ml de trypsine seule sont ajoutés, ce qui permet leur détachement de la paroi (agiter légèrement pour faciliter leur détachement). L'évolution du détachement cellulaire est suivie au microscope optique (Zeiss, Allemagne).

Lorsque la majorité des cellules est détachée, 5 ml de DHG + 10 % sérum sont ajoutés : le sérum contenant des inhibiteurs de protéases, la trypsine est inactivée. La boîte est ensuite splashée pour récupérer les cellules qui seraient encore accrochées à la paroi. Les cellules sont ensuite réparties après comptage à la densité désirée dans les boîtes ou les puits. Les boîtes de culture sont finalement incubées dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO<sub>2</sub>). Les cellules sont à nouveau repiquées lorsqu'elles sont arrivées à confluence et forment une monocouche cellulaire.

## II.2 Mise au repos des cellules

Le sérum présent dans le milieu de culture des cellules induit leur prolifération via l'activation de nombreuses voies de transduction du signal. Afin d'éteindre celles-ci au maximum avant d'incuber les cellules sous hypoxie ou en présence de TNF- $\alpha$ , les cellules sont mises au repos dans un milieu pauvre en sérum.

Une fois les cellules (L929 et COS-7) repiquées soit dans des T75, soit dans des plaques multi-puits ou encore dans des boîtes de Pétri, elles sont placées dans l'étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO<sub>2</sub>) pendant 24 heures.

Lorsque ce temps est écoulé, on décante le vieux milieu et on ajoute aux cellules non plus un milieu contenant 10 % de sérum mais un milieu contenant seulement 0,5% de sérum. Ensuite, les cellules sont remises dans l'étuve à 37°C pour une période de plus ou moins 5-6 heures.

Après cette période de repos, les cellules sont soit soumises à l'hypoxie, soit à la normoxie (voir point II.3). D'autre part, des cellules sont aussi incubées en présence de TNF- $\alpha$  (voir point II.4).

## II.3 Incubation sous hypoxie

### a) Matériel

- Milieu CO<sub>2</sub> indépendant (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté 2 % de sérum ainsi que 7,3 mg de glutamine pour 100 ml, 3 mg de pénicilline G pour 100ml, 40  $\mu$ l d'amphotéricine B pour 100 ml (stock à 0,5 mg/ml).

### b) Méthode

Pour les incubations sous hypoxie, le milieu des cellules à confluence est décanté et les cellules sont ensuite couvertes par du milieu CO<sub>2</sub> indépendant. La hauteur de ce milieu modifié doit être réduite à un fin film afin de faciliter la diffusion des gaz atmosphériques tout en empêchant la dessiccation des cellules. Un volume correspondant à 1 ml pour l'hypoxie de 8 heures des cellules COS-7 est ajouté dans les puits des plaques à 6 puits. Par contre, pour les cellules L929 subissant une hypoxie de 18 heures, on ajoute un volume de 1,5 ml dans chaque puits. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur où règne une atmosphère composée à 100 % d'azote (créée par un flux de 5 minutes) et incubées à 37 °C. Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions mais dans une atmosphère normale ou normoxie.

Dans certaines expériences, les cellules ont été incubées en présence de différents inhibiteurs en hypoxie et en normoxie :

- en présence d'un inhibiteur de caspases, le Z-V-A-D-fmk (R&D Systems, Minneapolis, USA) dont la concentration finale est de 50  $\mu$ M. Cet inhibiteur est ajouté au milieu CO<sub>2</sub> indépendant.



- en présence de molécules chimiques induisant ou inhibant l'expression de HIF-1 $\alpha$ . La lactacystine (Calbiochem Corporation, La Jolla, USA) et le chlorure de Cobalt (Sigma, Saint Louis, USA) seront utilisés afin d'augmenter l'expression de HIF-1 $\alpha$ . Par contre, pour inhiber l'expression de HIF-1, on utilisera la geldanamycine (Calbiochem Corporation, La Jolla, USA).

Concentrations finales de ces molécules dans le milieu CO<sub>2</sub> indépendant :

- lactacystine      100 nM
- geldanamycine    2 nM
- CoCl<sub>2</sub>            125  $\mu$ M.

## II.4 Mise en présence des cellules de TNF- $\alpha$

### *a) Principe*

Le TNF- $\alpha$  est connu dans la littérature pour être un inducteur de l'apoptose. Nous avons incubé les différents types cellulaires en présence de TNF- $\alpha$  afin d'obtenir un contrôle positif de l'apoptose cellulaire.

### *b) Méthode*

Après avoir repiqué les cellules et incubé celles-ci en présence de milieu contenant 0,5 % de sérum, on ajoute dans leur milieu le TNF- $\alpha$  à une concentration de 5  $\mu$ g/ml dans le milieu DHG + 0,5 % de sérum pour les cellules L929 ou DMEM + 0,5 % de sérum pour les cellules COS-7. Ensuite, les cellules sont remises dans l'étuve à 37°C (95 % d'air humide et 0,5 % de CO<sub>2</sub>) pour une durée de 18 heures. En parallèle, on réalise des contrôles incubés 18 heures dans l'étuve à 37°C uniquement en présence du milieu contenant 0,5 % de sérum.

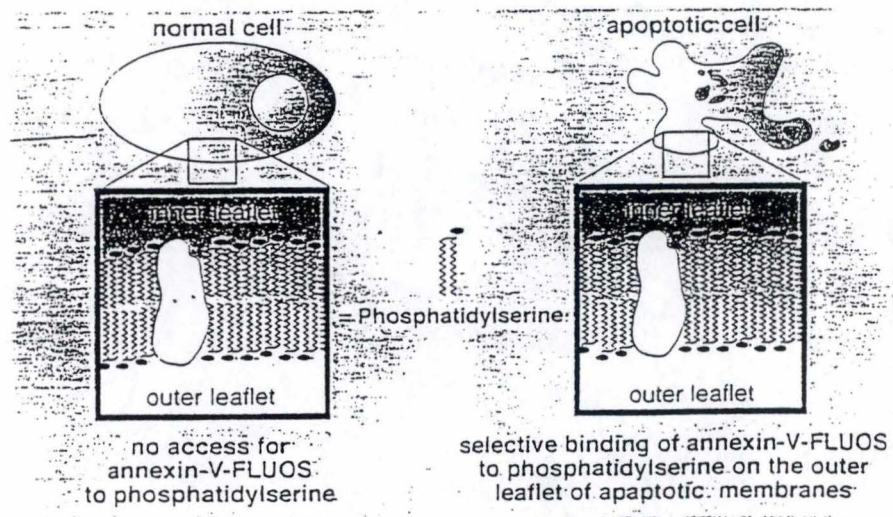


Figure II-1 : Détection des changements morphologiques de la surface des cellules durant l'apoptose  
(D'après Boehringer Mannheim, Allemagne).

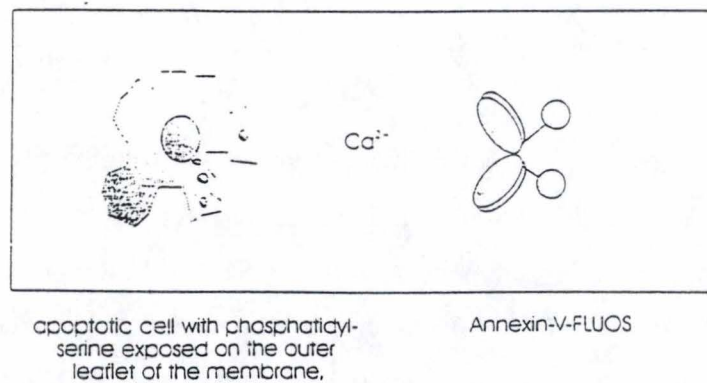


Figure II-2 : Principe de la coloration à l'annexine V  
(D'après Boehringer Mannheim, Allemagne).



## II.5 Coloration à l'Annexine-V

### a) Principe

Lorsque des cellules sont en apoptose, des changements se déroulent au niveau de leur membrane plasmique. On peut alors observer chez ces cellules «un flip-flop» de la phosphatidyl sérine (PS). En effet, en conditions normales on retrouve la PS dans le feuillet interne de la membrane plasmique tandis que chez des cellules en apoptose, on la retrouve plutôt dans le feuillet externe (Figure II-1). En utilisant l'annexine V, une protéine calcium dépendante se liant spécifiquement aux phospholipides et en particulier à la PS, on pourra différencier les cellules en apoptose par rapport à celles qui n'y sont pas. L'annexine V est couplée à la fluorescéine (Figure II-2).

Cependant, les cellules en nécrose présentent, elles aussi, des PS au niveau du feuillet externe de leur membrane plasmique. Afin de différencier les cellules en apoptose des cellules en nécrose, on ajoute de l'iodure de propidium qui ne pénètre que dans les cellules dont la perméabilité de la membrane plasmique est perturbée, c'est-à-dire dans les cellules en nécrose. L'iodure de propidium se fixe à l'ADN et colore les noyaux en rouge. Au microscope à fluorescence, on pourra donc observer en vert les cellules en apoptose et en nécrose et en rouge seulement les cellules en nécrose. Cette technique nous permettra ainsi de quantifier le nombre de cellules en apoptose par rapport à la population totale de cellules.

### b) Matériel

- Kit Annexin-V-FLUOS Staining de la firme Boehringer Mannheim (Cat. N°1 858 777) contenant l'Annexine V marquée à la fluorescéine, l'iodure de propidium et un tampon Hepes.
- Boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (Falcon, Plymouth, Grande-Bretagne).
- Lamelles couvre-objet 2 x 2 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lame porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).

- Prolong (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

### c) Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri contenant une lame couvre- objet. Ces lames sont préalablement coatées avec de la polylysine 0,01 % (Sigma, Saint-Louis, USA) afin que les cellules adhèrent mieux à celle-ci.

Après les différents traitements en hypoxie et en normoxie, ainsi que le traitement au TNF- $\alpha$ , les lames couvre-objets sont incubées en chambre humide en présence de la solution de coloration (50  $\mu$ l d'annexine V, 50  $\mu$ l d'iodure de propidium et 1 ml de tampon Hepes). On réalise une chambre humide au moyen d'une grande boîte de Pétri au fond de laquelle on place un filtre humide. On met sur ce filtre autant de morceaux de parafilms qu'il y a de tests. On y dépose une goutte de 100  $\mu$ l de la solution de coloration puis on recouvre d'une lamelle en veillant à ce que les cellules soient du côté de la solution. On ferme ensuite hermétiquement la boîte de Pétri pour éviter toute évaporation. La chambre humide est ensuite placée dans l'obscurité à 4°C pendant 15 minutes.

Après ce temps d'incubation, les couvre-objets sont montés sur lames. Pour cela, on utilise le milieu de montage Prolong que l'on chauffe préalablement à 37°C.

L'observation en fluorescence est réalisée immédiatement.

## II.6 Coloration tunel

### a) Principe

Lorsque des cellules sont en apoptose, une de leurs caractéristiques principales est la fragmentation de leur ADN en morceaux de 180 bp et de multiples de 180 bp. La technique de la coloration tunel utilise une enzyme, la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) qui catalyse la polymérisation de nucléotides à l'extrémité libre 3'OH de ces fragments d'ADN. Les nucléotides, ajoutés à cette extrémité 3'OH contiennent de la fluorescéine. Si on ajoute ensuite, des anticorps anti-fluorescéine couplés à une peroxydase, puis le substrat de cette peroxydase, on pourra alors visualiser au microscope optique



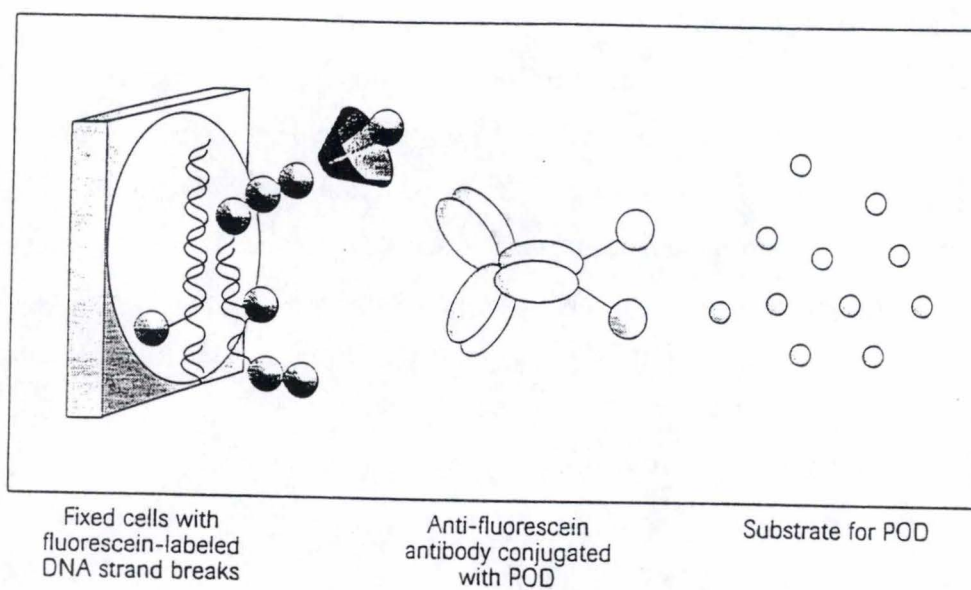


Figure II-3 : Principe de la coloration tunel  
(D'après Boehringer Mannheim, Allemagne).

les cellules en apoptose (Figure II-3). En effet, celles-ci montreront une coloration brune de leur noyau.

*b) Matériel*

- PBS (Phosphate Buffer Saline).

Pour 100 ml : - 0,9 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- 2 ml de tampon  $\text{KH}_2/\text{K}_2 \text{HPO}_4$  0,5 mM pH 7,4

porter à volume avec de l'eau distillée.

- Solution de fixation : paraformaldéhyde 4 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans du PBS.
- Solution de perméabilisation : triton X-100 1 % dilué dans du PBS (Sigma, St Louis, USA).
- Solution de blocage :  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% dilué 100x dans du méthanol.
- Boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (Falcon, Plymouth, Grande-Bretagne).
- Lamelles couvre-objet de 2 x 2 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Kit de la firme Boehringer Mannheim (In Situ Cell Death Detection, POD ; Cat.N° 1 684 817).
- DAB substrate (Boehringer Mannheim) : concentré 10x (diaminobenzidine).
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Angleterre).

*c) Méthode*

Après les différents traitements en hypoxie et en normoxie ainsi que le traitement au  $\text{TNF-}\alpha$ , le milieu des cellules est décanté à la pipette pasteur. Ensuite, les cellules sont fixées pendant une heure à température ambiante par la solution de fixation (paraformaldéhyde 4%). Après ce temps d'incubation, les cellules sont rincées 2x avec du PBS. Ensuite, on ajoute la solution de blocage et on la laisse agir pendant 10 minutes à température ambiante. Ce traitement



est destiné à inhiber les peroxydases endogènes. De nouveau, les cellules sont rincées 2x avec du PBS.

Ensuite, on utilise le principe de la chambre humide. Il s'agit d'une grande boîte de Pétri au fond de laquelle on place un filtre humide. On met sur ce filtre autant de morceaux de parafilm qu'il y a de tests. On y dépose une goutte de 50  $\mu$ l de la solution tunel (solution contenant l'enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase), ainsi que les nucléotides marqués à la fluorescéine) puis on recouvre d'une lamelle en veillant à ce que les cellules soient du côté de la solution. On ferme ensuite hermétiquement la boîte de Pétri pour éviter toute évaporation. L'incubation dure 1 heure à température ambiante. Les couvre-objets sont ensuite rincés 3x avec du PBS. Lorsque ce rinçage a été effectué, on réutilise le principe de la chambre humide mais cette fois-ci, on dépose 50  $\mu$ l de solution contenant les anticorps anti-fluorescéine couplés à la peroxydase, sur les morceaux de parafilm. Le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes. De nouveau, les cellules sont rincées 3x avec le PBS. La chambre humide est alors utilisée une dernière fois, en déposant sur les morceaux de parafilm une goutte de 50  $\mu$ l de DAB substrat qui est le substrat de la peroxydase, on dépose ensuite les couvre-objets sur ces gouttes toujours en veillant que les cellules soient du bon côté. Une courte incubation de 5 minutes à température ambiante suivra. Ensuite, on rince les cellules une dernière fois avec 3x 1ml de PBS. Les couvre-objets sont ensuite montés sur les lames à l'aide de Mowiol que l'on préchauffe préalablement à une température de plus de 57°C.

## II.7 Cell Death Detection Elisa

### a) Principe

Deux formes de mort cellulaire eucaryotique peuvent être distinguées selon des critères morphologiques et biochimiques, il s'agit de la nécrose et de l'apoptose. Le phénomène de nécrose s'accompagne de l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique aux ions entraînant le gonflement de la cellule et la rupture de la membrane plasmique en quelques minutes. L'apoptose

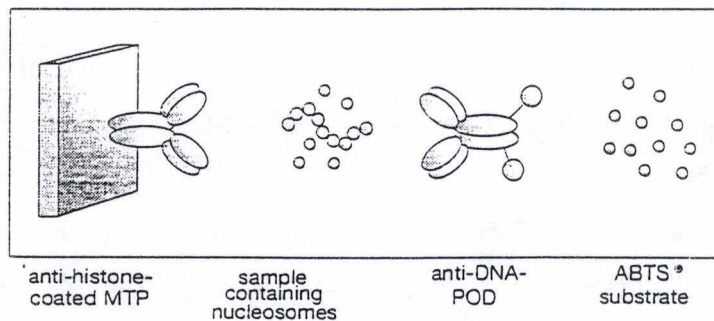


Figure II-4 : Principe de la technique Cell Death Detection Elisa  
(D'après Boehringer Mannheim, Allemagne).

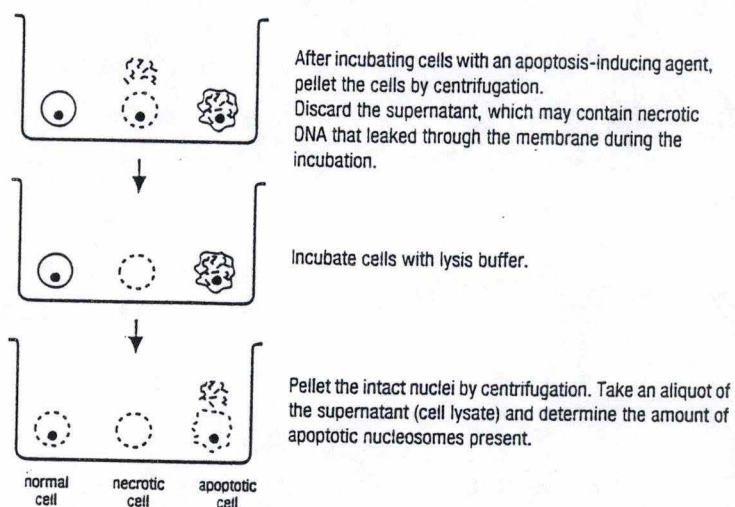


Figure II-5 : Récupération des échantillons cellulaires pour la technique de Cell Death Detection Elisa  
(D'après Boehringer Mannheim, Allemagne).



est caractérisée par la condensation du cytoplasme, la formation de corps apoptotiques et de l'activation d'une endonucléase. Cette dernière clive l'ADN accessible, à savoir l'ADN présent dans les régions internucléosomiques, générant ainsi des mono- et des oligonucléosomes. L'ADN nucléosomique complexé aux histones est quant à lui protégé du clivage par l'endonucléase.

Le kit ELISA "DNA fragmentation" permet de quantifier la fragmentation de l'ADN qui a lieu durant le processus apoptotique en mesurant la présence de nucléosomes dans le cytoplasme. Un premier set d'anticorps (Ac) anti-histones est utilisé pour "coater" la boîte ELISA. Ces Ac reconnaissent et lient les protéines histones sur lesquelles l'ADN est toujours fixé. L'ADN est ensuite reconnu par un deuxième lot d'Ac anti-ADN couplés à la peroxydase. La quantité de peroxydase présente dans l'immunocomplexe sera évaluée photométriquement en utilisant l'ABTS comme substrat de l'enzyme (Figure II-4).

#### b) Matériel

- Kit de la firme Boehringer Mannheim (Cat n° 1 544 675).
- Plaque multi-puits de 6 puits (Costar, Corning, New York, USA).

#### c) Méthode

1. Les cellules sont repiquées dans des boîtes multi- puits à 6 puits (250 000 cellules par puits).  
Après les différents traitements d'hypoxie, de normoxie et de TNF- $\alpha$ , les échantillons cellulaires sont récupérés.
2. Récupération des échantillons cellulaires (Figure II-5) :
  - Pipeter le surnageant et le transvaser dans des tubes Ependorf.
  - Mettre les boîtes multi-puits sur glace.
  - Centrifuger les tubes Ependorf à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C.

- Décanter le surnageant et garder le culot. Cette étape permet de récupérer les corps apoptotiques qui se trouveraient éventuellement dans le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 0,5 ml de tampon de lyse. Ces 500 µl de tampon de lyse sont ensuite ajoutés dans le puits correspondant.
- Incubation pendant 30 minutes à 4°C. Cette étape permet la lyse cellulaire.
- Récupération du lysat et centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes.
- Récupération de 400 µl de surnageant en veillant à ne pas toucher le culot qui contient les débris cellulaires et l'ADN non fragmenté.
- A cette étape, les échantillons peuvent être congelés à -20°C.

### 3. Dosage proprement dit :

Pour ce dosage on utilise des microplaques de 96 puits. Ces puits sont dans un premier temps coatés avec la solution contenant les anticorps anti-histone. On ajoute 100 µl de cette solution dans chaque puits puis on incube pendant une heure à température ambiante. Après avoir décanter les puits, on ajoute du tampon bloqueur dont le rôle est de saturer les sites de fixation non spécifiques. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, on décanter les puits et on dépose alors 100 µl de chaque échantillon cellulaire dans les puits. Après une incubation de 1h30 à température ambiante, les puits sont ensuite rincés trois fois avec à chaque fois 250-300 µl de solution de lavage. Après ce premier lavage, on dépose dans chaque puits 100 µl de solution contenant les anticorps anti-ADN couplés à une peroxydase qui vont fixer l'ADN se trouvant dans les échantillons. Le temps d'incubation de cette étape est de 1h30 toujours à température ambiante. De nouveau, les puits sont rincés trois fois avec à chaque fois 250-300 µl de solution de lavage. Pour terminer le dosage, on ajoute dans chaque puits 100 µl de la solution contenant le substrat de la peroxydase c'est-à-dire l'ABTS (2,2' -azino-di(3 -ethylbenzothiazoline sulfonate)). Grâce à ce substrat on peut déterminer de manière photométrique quelle quantité de peroxydase est retenue dans les immunocomplexes.



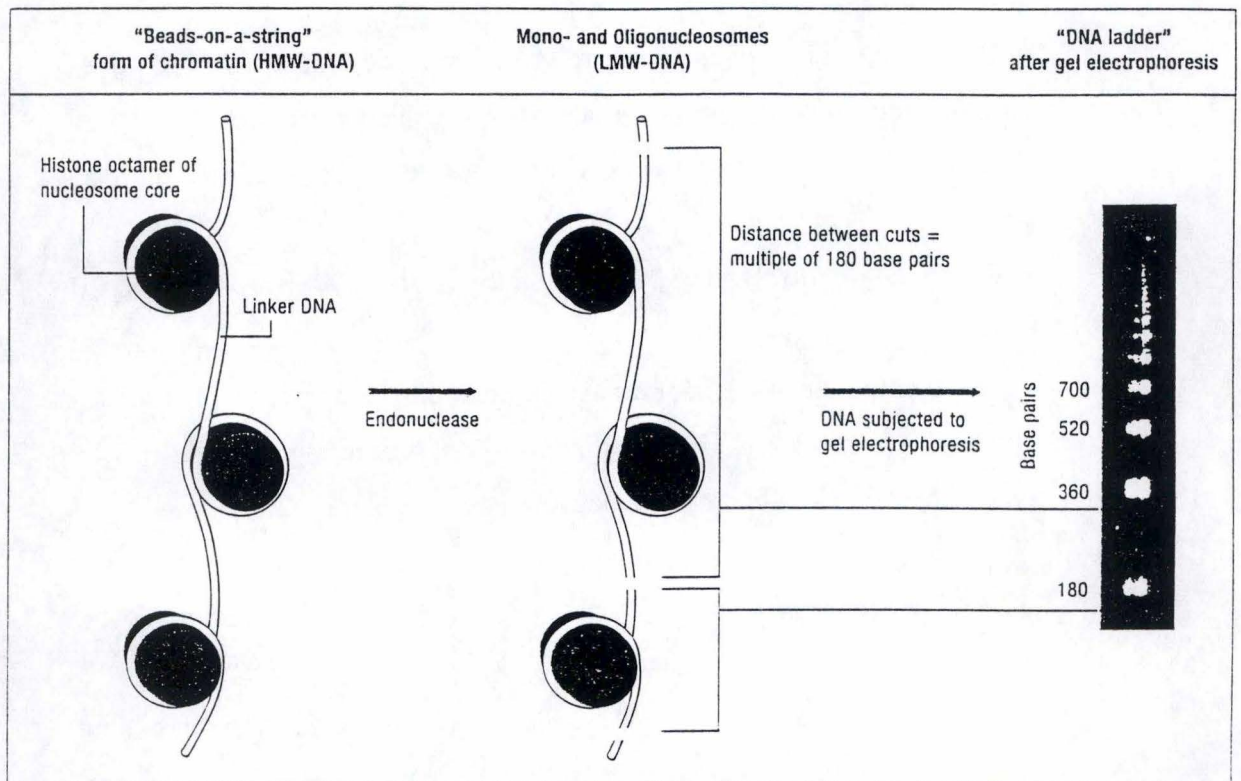


Figure II-6 : Biochimie de la fragmentation de l'ADN et apparence de la « DNA ladder » (D'après Boehringer Mannheim, Allemagne).

La lecture des résultats se fait à l'aide d'un lecteur de microplaque, à une longueur d'onde de 405 nm. Après lecture à 405 nm, la moyenne des valeurs obtenues pour les blancs est soustraite de chacune des valeurs des différents tests. Chaque test étant réalisé en triplicat, une moyenne est calculée pour chaque test après soustraction de la valeur moyenne du blanc.

## II.8. DNA ladder

### a) Principe

L'ADN clivé entre les nucléosomes par la DNase activée lors de l'apoptose possède une taille de 180 bp ou de multiple de 180 bp. Ces petits fragments peuvent être visualisés après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure II-6).

### b) Matériel

- Boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75, Costar, Corning, New York, USA).
- Tampon de lyse :
  - ◆ 100 mM NaCl (Merck, Darmstad, Allemagne).
  - ◆ 10 mM Tris Tris pH 8.0.
  - ◆ 25 mM EDTA (Merck, Darmstad, Allemagne).
  - ◆ + à la dernière minute 0,4 mg/ml de protéinase K (Merck, Darmstad, Allemagne) dont le rôle est de digérer toutes les protéines.
- Solution : chloroforme/ phénol/ isoamylalcool (25/24/1) (Sigma, Saint-Louis, USA).
- Isopropanol (Merck, Darmstad, Allemagne).
- Ethanol 70 % (Merck, Darmstad, Allemagne).
- Tampon Tris + EDTA pH8 (tampon TE).
- RNase (stock 10 mg/ml).



c) Méthode

- Décanter le vieux milieu des boîtes T75.
- Ajouter 1 ml de tampon de lyse dans chaque boîte.
- Racler les cellules et récupérer le lysat dans des tubes Eppendorf.
- Incubation pendant toute la nuit à 37°C.
- Ajouter 1 ml de la solution chloroforme/phénol/isoamylalcool (25/24/1) et mélanger.
- Centrifuger quelques secondes à 13 000 rpm (Heraus, Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Récupérer la phase aqueuse se trouvant au-dessus et contenant normalement l'ADN.
- Ajouter un volume de chloroforme (environ 900 µl), mélanger et centrifuger quelques secondes à 13 000 rpm (Heraus, Sepatech, Biofuge pico, rotor 3324).
- Récupérer la phase aqueuse (900 µl) et ajouter 630 µl d'isopropanol dont le rôle est de précipiter l'ADN.
- Précipitation pendant au moins 18 heures à -20°C.
- Centrifuger à 13 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C.
- Décanter le surnageant et laver le culot avec 800 µl d'éthanol 70 % RT.
- Centrifuger deux minutes à 13 000 rpm.
- Décanter le surnageant et sécher le culot.
- Resuspendre l'ADN dans 100 µl de tampon TE + 2 µl de RNase (10 mg/ml).
- Incuber 2 heures à 37°C.
- Doser l'ADN.
- Charger 20 µg d'ADN sur un gel d'agarose 1,5 % en présence de bromure d'éthidium.
- Migrer deux heures à 80 V.

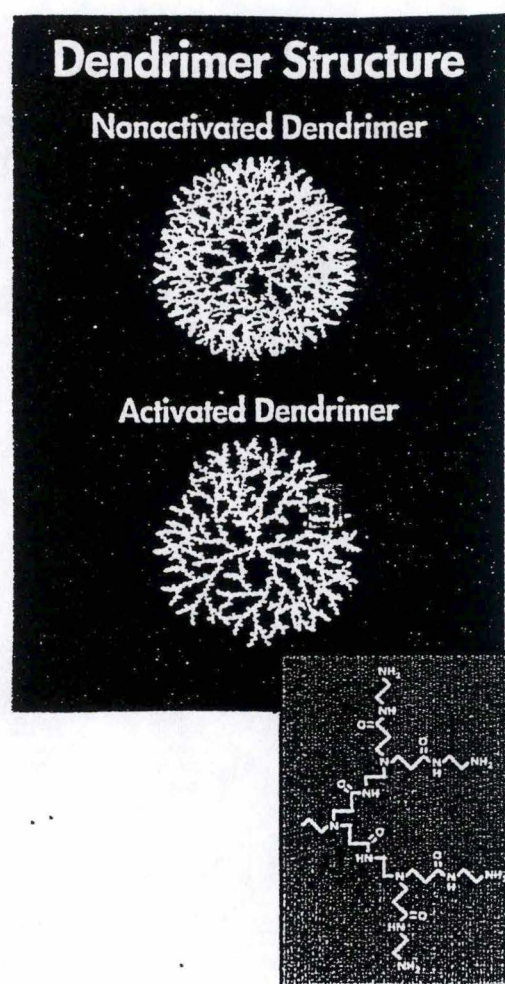


Figure II-7 : Structure du superfect (Qiagen, Hilden, Allemagne).



## II.9 Transfections

### a) Principe

Les méthodes de transfection permettent d'introduire de l'ADN dans les cellules d'eucaryotes et d'étudier notamment la modulation de l'expression d'un gène rapporteur en fonction du promoteur qui le précède ou l'effet de la surexpression d'une protéine. Dans nos expériences, des cellules COS-7 et des cellules L929 sont transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc codant pour la sous-unité HIF-1 $\alpha$  du facteur HIF-1. On utilise également comme plasmide contrôle le plasmide pCMV-Myc. C'est dans ce plasmide que D. Mottet a inséré l'ADNc codant pour HIF-1 $\alpha$ . Le promoteur fort utilisé pour surexprimer HIF-1 $\alpha$  est CMV IE (cytomegalovirus immediate early promoteur/enhancer).

### Transfection des cellules par le SUPERFECT

#### b) Matériel

- Plaque multi-puits de 6 puits (Costar, Corning, New York, USA).
- SUPERFECT (3 mg/ml) (Qiagen, Hilden, Allemagne) (Figure II-7).
- PBS (Phosphate Buffer Saline)

Pour 100 ml : - 0,9 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- 2 ml de tampon  $\text{KH}_2/\text{K}_2\text{PO}_4$  0,5 mM pH 7,4

porter à volume avec de l'eau distillée.

#### c) Méthode

- Pour une plaque multi-puits (6 puits),ensemencer 250000 cellules par puits dans 2 ml de milieu 10 % sérum.
- Laisser en culture 24 heures

**Pour un puits d'une plaque :**

➤ Réaliser un mix plasmide :

- 3 µg plasmide
- 6 µl de SUPERFECT porté à 150 µl avec du milieu sans sérum
  
- Laisser reposer 5 à 10 minutes à température ambiante.
- Pendant ce temps, laver les cellules avec 2 ml de PBS stérile pour les puits
- Ajouter 1ml de milieu seul au mélange ADN/SUPERFECT
- Ajouter 1ml du mélange ADN/SUPERFECT/milieu seul par puits
- Incuber 3 heures dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO<sub>2</sub>).
- Eliminer le milieu et laver les cellules avec 2 ml de PBS stérile par puits.
- Ajouter du milieu frais contenant 10 % de sérum et laisser reposer les cellules dans une étuve à 37°C (95 % d'air humide et 5 % CO<sub>2</sub>).

Après avoir été transfectées, les cellules sont traitées selon le point II.2 et II.3, c'est-à-dire l'hypoxie ou la normoxie. D'autre part, elles sont aussi incubées en présence de TNF- $\alpha$ .

## II.10 Western blot

### a) Principe

La technique du Western blot permet de détecter une protéine particulière dans un extrait cellulaire. Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

- Séparation des protéines de l'extrait par électrophorèse.
- Transfert des protéines sur un support solide, en l'occurrence une membrane immobilisée.
- Traitement de la membrane afin de limiter la fixation non spécifique.



- Détection de la protéine recherchée par un anticorps spécifique.
- Révélation par chémiluminescence, par le système ECL (Enhanced ChemiLuminescence).

Plusieurs Western Blot seront effectués afin de détecter et de quantifier la présence de protéines suivantes : HIF-1 $\alpha$ , Bax et p53.

Les extraits protéiques proviennent de cellules ayant subi différents traitements que sont l'incubation en hypoxie ou normoxie ou en présence de TNF- $\alpha$ .

## II.10. 1 Méthode de préparation des extraits protéiques

### *a) Matériel*

- Tampon de lyse composé de :
  - Tris 40 mM pH 7,5 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - KCl 300 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - EDTA 2 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - Triton X-100 1 % (Sigma, St Louis, USA).
  - Inhibiteurs de protéases et de phosphatases en tablette (Complete, Boehringer, Mannheim, Allemagne).
  - Eau distillée.
- Racloir stérile (TPP, Europe ) afin de décrocher les cellules du fond de la boîte de culture.

### *b) Méthode*

Les cellules sont repiquées dans des T75. Au terme de leur incubation sous hypoxie et/ou normoxie ou en présence ou en absence de TNF- $\alpha$ , les boîtes sont décantées à l'aide d'une pipette pasteur. Les cellules sont ensuite lysées avec 500  $\mu$ l de tampon de lyse et raclées avant d'être récoltées dans un tube Eppendorf. Après une incubation de 30 minutes à 4°C, le lysat cellulaire est centrifugé pendant 15 minutes à 15000 rpm à 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge

17RS, rotor 1379) afin d'éliminer l'ADN et les débris cellulaires. Le surnageant est finalement récupéré dans de nouveaux tubes Eppendorfs.

## II.10.2 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Grâce à cette méthode, on peut la quantité de protéines se trouvant dans chaque échantillon sera déterminée. Une fois ces quantités connues, on peut alors charger sur le gel d'électrophorèse exactement la même quantité de protéines pour chaque échantillon.

### a) Méthode

- Diluer le colorant (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Allemagne ) 5x dans de l'eau.
- Filtrer la solution avec un filtre à café.
- Pour chaque test, ajouter 1 ml de colorant.
- Ajouter toutes les minutes un volume donné d'échantillon à doser.
- Laisser agir 5 minutes.
- Doser au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.
- Prévoir un tube avec l'étalon (n'ajouter que 3,7 µl), un avec le blanc étalon (ajouter 3,7 µl d'eau) et un blanc avec le tampon dans lequel se trouvent les échantillons (même volume que pour les échantillons).

Les dosages sont réalisés en duplicat.

La formule à utiliser pour estimer la quantité de protéines est la suivante :

$$\frac{((\text{Moyenne test} - \text{Moyenne blanc})/(\text{Moyenne étalon} - \text{Moyenne Blanc étalon})) \times 5}{\text{Volume des échantillons}}$$

## II.10.3 Electrophorèse

### a) Matériel



- Gel séparateur d'acrylamide 12 % ou 10% (le pourcentage est à ajuster en fonction du PM des protéines que l'on veut mettre en évidence). Celui-ci est composé de :

- 35 ml de gel mix :

GEL MIX	12 %	10 %
Tampon du gel	60 ml	60 ml
Acryl/Bis (30/0.8)	100 ml	83 ml
H <sub>2</sub> O	90 ml	125 ml

Tampon du gel (200ml) : tampon Tris 2M pH 8,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne)

→ 36,3 g TRIS + 0,8 g SDS (pH8,9)

La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C.

Acryl/Bis (30/0,8) : acrylamide 30 %/N,N'-méthylène bisacrylamide 0,15 %. Cette solution se conserve maximum 6 semaines à 4°C à l'abri de la lumière.

H<sub>2</sub>O : eau distillée.

- 10,5 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA).
- 175 µl d'ammonium persulfate 25 % (0,05 g/1 ml d'H<sub>2</sub>O) fraîchement préparé (Serva, Verviers, Belgique).

- Gel concentrateur composé de :

- 10 ml de Spacer gel mix

SPACER GEL MIX	
Tampon du gel	60 ml
Acryl/Bis (30/0,8)	40 ml
H <sub>2</sub> O	140 ml

Tampon du gel (100 ml) : tampon Tris 2 M pH 6,8 (Merck, Darmstad Allemagne). La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C.

Acryl/Bis (30/0,8) : acrylamide 30 %/N,N'-méthylène bisacrylamide 0,8 %.

Cette solution se conserve maximum 1,5 mois à 4°C à l'abri de la lumière.

H<sub>2</sub>O : eau distillée.

- 3 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA).
- 50 µl d'ammonium persulfate 25 % (0,05 g/1ml d'H<sub>2</sub>O) fraîchement préparé (Serva, Verviers, Belgique).

- Le tampon d'électrophorèse est dilué 4X avant usage à partir d'une solution stock composée de :

- Tris 0,05 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)/glycine 0,38 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- SDS 0,1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Cette solution se conserve à température ambiante pendant un mois maximum.

- Le tampon d'échantillon est composé de :

- Tris-HCl 1 M pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- SDS 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Glycérol 20 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Bleu de bromophénol 1 % (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
- Mercaptoéthanol 4 % (Sigma, St Louis, USA).

- Etalon Rainbow (Amersham, Buckeinghamshire, Angleterre).

### b) Méthode

Une fois le montage des plaques réalisé, on coule le gel séparateur entre les plaques et ce jusqu'à environ 1,5 cm en dessous du peigne. On ajoute alors à la surface du gel ainsi coulé de l'isobutanol saturé en eau pour éviter que le gel ne se dessèche en surface et pour favoriser la polymérisation en le préservant de l'oxygène.



Après polymérisation du gel (minimum 1h30), l'isobutanol est enlevé et la surface du gel est rincée avec de l'eau distillée. On enlève l'excès d'eau avec un papier Whatman puis le gel concentrateur est coulé jusqu'au bord des plaques. On place le peigne. La polymérisation du gel prend 45 à 60 minutes.

Pendant ce temps, les différents échantillons sont préparés. On prélève de chaque fraction le volume adéquat pour atteindre 20 µg de protéines. Les échantillons sont portés à un même volume avec de l'H<sub>2</sub>O. Ensuite, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 3 minutes.

Une fois le gel concentrateur polymérisé, les échantillons et l'étalon préparés, on enlève délicatement le peigne ainsi que les pinces puis on place le gel dans la cuve à électrophorèse avec du tampon d'électrophorèse. Ensuite, on dépose les échantillons dans le fond des puits et on les fait migrer pendant 1 heure 30 à 30 mA (à travers le gel concentrateur) puis entre 3 et 4 heures à 45 mA (à travers le gel séparateur).

#### II.10.4 Transfert

##### a) Matériel

- Tampon de transfert :
  - tampon Tris 0,5 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - glycine 0,76 M (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 8,3 auquel on ajoute du méthanol 20 % final (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
  - membrane immobilone (Bio-Rad, Richmond, USA).

##### b) Méthode

Le transfert («blotting») se réalise en 3 étapes : une étape préliminaire qui consiste à préparer la membrane, l'arrêt de l'électrophorèse et la préparation du système de transfert («système sandwich»).

On utilise pour le transfert une membrane immobilone, c'est une membrane en diofluorure de polyvylidène de la grandeur du gel séparateur, que l'on immerge pendant 1 minute dans du méthanol 100 % puis que l'on équilibre avec du tampon de transfert pendant 15 minutes.

Lorsque le front de migration visualisé par le bleu de bromophénol se trouve à environ 1 cm du bas du gel, on arrête l'électrophorèse.

Ensuite, on démoule le gel et on dépose dessus une membrane sur laquelle on peut alors déposer deux feuilles de papier Whatman (3 mm) de la grandeur du gel et une éponge, préalablement imbibés de tampon de transfert. On réalise ainsi un premier «demi-sandwich» que l'on peut alors déposer sur l'appareil de transfert (2217 Multophor II Electrophoresis Unit, LKB, Suède). L'autre moitié du « sandwich » est ensuite mise en place : sur l'autre face du gel, on superpose de nouveau deux feuilles de papier Whatman (3mm) et une éponge. Il faut toujours veiller à ce que l'ensemble ne dessèche pas et il faut aussi veiller que des bulles ne se forment empêchant ainsi le bon déroulement du transfert.

Le «système sandwich» est déposé dans l'appareil de sorte que le gel soit du côté du pôle négatif et donc la membrane du côté du pôle positif. Les protéines, chargées négativement (électrophorèse au SDS), vont migrer du gel vers la membrane. Le tampon contenant du méthanol facilite la capacité de fixation de la membrane et la stabilité du gel. Pour terminer, on rajoute dans la cuve le tampon de transfert. On réalise le transfert toute la nuit à 30 Volts.

## II.10.5 Traitement et révélation

### a) Matériel

- Blotto 5 % à préparer le jour même :

- PBS 1X final dilué à partir d'une solution stock de PBS 10X.
- Lait en poudre 5 % (Gloria).



- Merthiolate 0,001 % (Fluka, Milan, Italie) dilué à partir d'une solution stock de 1 % (conservée à température ambiante).
- 0,1 % de Tween 20 (Sigma, St Louis, USA).

- Solution TBS + Tween 20 à 0,1 % pH 7,4.

On prépare une solution stock constituée de Tris 0,2 M (8832, Merck, Darmstadt, Allemagne), NaCl 1,37 M (Merck, Darmstadt, Allemagne). Cette solution se conserve à température ambiante et le jour de l'expérience, elle est diluée 10 x de la manière suivante :

- 100 ml de la solution stock
- 900 ml d'eau distillée
- 1 ml de Tween 20

De cette solution, on retire 100 ml qui serviront à diluer l'anticorps avant d'ajouter 0,1 % de lait en poudre (Gloria) aux 900 ml restant.

- Anticorps primaires :

- \* anticorps de souris anti-HIF-1 $\alpha$  (Transduction Laboratories, Lexington, USA).
- \* anticorps de souris anti-p53 (PharMingen International, USA)
- \* anticorps de lapin anti-Bax (PharMingen International, USA)

- Anticorps secondaires : \* anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique).
- \* anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham, Gand, Belgique).

b) Méthode

Le lendemain matin, on termine le transfert en augmentant le voltage à 50 Volts pendant 30 minutes. La membrane est alors placée dans une bouteille en plastique en présence de 30 ml de Blotto 5 % pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation. Le Blotto 5 % va saturer la membrane et donc empêcher les fixations non spécifiques des anticorps. La membrane est alors rincée 3 x (1 x 15 minutes et 2 x 5 minutes) avec la solution de TBS-T 1 x à laquelle on a ajouté 0,1 % de lait en poudre.

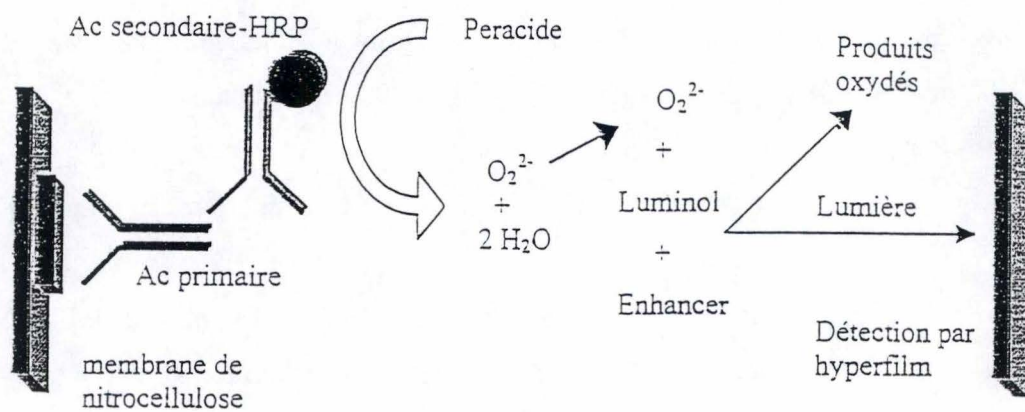


Figure II-8 : Principe de révélation par le système ECL (Enhanced ChemiLuminescence) aboutissant finalement à la production de lumière après oxydation du luminol par des anions superoxydes. Cette lumière sera alors détectée par un hyperfilm (D'après Amersham, Belgique).



Pour localiser sur le support la protéine d'intérêt, nous utilisons un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement cette protéine. La détection se fait de manière indirecte puisque l'on ajoute un second anticorps qui reconnaît le premier. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase qui va catalyser la réaction de décomposition de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et en  $\text{O}_2^-$ .  $\text{O}_2^-$  est alors révélé par chémoluminescence en présence de luminol. Celui-ci oxydé peut retourner à son état fondamental en émettant de la lumière qui sera détectée sur un film (Figure II-8). On voit donc apparaître une bande sur le film à l'endroit où se trouve la protéine d'intérêt.

En pratique, la membrane est incubée 2 heures en présence de l'anticorps primaire dilué 2000 x dans le TBS-T + 0,1 % lait. Les anticorps non fixés sont éliminés par 3 rinçages de 15 minutes avec du TBS-T + 0,1 % de lait. La membrane est ensuite incubée durant 45 minutes à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans du TBS-T + 0,1 %. Rincée 1 x 15 minutes avec du TBS-T + 0,1 % lait puis 4 x 5 minutes avec du TBS-T sans lait, la membrane est alors mise en présence du liquide de révélation pendant 1 minute.

## II.10. 6 Révélation du film

### a) Matériel

- Film d'exposition : hyperfilm MP (Amersham, Gand, Belgique).
- Pour révéler les films, on utilise le révélateur PQ Universal dilué 5X et le fixateur Hypam lui aussi dilué 5X (Ilford, Suisse).

### b) Méthode

Après avoir soigneusement enlevé un maximum de liquide révélateur en l'absorbant sur un papier Whatman, on place la membrane dans une cassette d'autoradiographie et, en chambre noire, on dépose un film sur celle-ci. On

expose le film 1 minute. Si après le développement le signal est trop intense, il convient de diminuer le temps d'exposition et, dans le cas contraire, de l'augmenter.

Pour développer le film, on le place dans le révélateur jusqu'à ce qu'apparaissent les bandes, puis dans de l'eau distillée et enfin dans un bain contenant le fixateur. Pour terminer, le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre. Pour conserver la membrane, elle doit être scellée entre 2 transparents et congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## II.11 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique qui permet de localiser des protéines au sein des cellules grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de la protéine recherchée. Ces anticorps sont ensuite détectés au moyen d'anticorps anti-immunoglobuline qui sont par ailleurs couplés chimiquement à des fluorochromes comme la rhodamine qui émet une lumière rouge quand on l'irradie avec la fréquence d'excitation appropriée.

### a) Matériel et solutions

- Boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (Falcon, Plymouth, Grande-Bretagne).
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lame porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (Phosphate Buffer Saline).

Pour 100 ml : - 0,9 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)

- 2 ml de tampon  $\text{KH}_2 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 mM pH 7,4

porter à volume avec de l'eau distillée.

- Paraformaldéhyde 4 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans du PBS.
- Triton X-100 1 % dilué dans du PBS (Sigma, St Louis, USA).



- PBS + BSA 3 % : PBS pour diluer les anticorps contenant 3 % d'albumine de sérum bovin (Sigma, St Louis, USA).
- Anticorps primaires : ♦ anticorps anti-p53 (PharMingen International) dilué 50x dans du PBS + BSA 3%  
♦ anticorps anti-Bax (PharMinger International) dilué 1000x dans du PBS + BSA 3%
- Anticorps secondaires : - anticorps Alexa 488 de chèvre anti-IgG de souris dilué 1000 x dans du PBS + BSA 3 % (Molecular Probes, Eugene, USA).  
- anticorps Alexa 568 de chèvre anti-IgG de lapin dilué 1000 x dans du PBS + BSA 3 % (Molecular Probes, Eugene, USA).
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Angleterre).

#### *b) Méthode*

Après avoir été repiquées dans des boîtes de Pétri contenant une lamelle porte-objet, puis incubées sous hypoxie ou normoxie de manière identique à celle décrite précédemment, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS. Ensuite, les cellules sont fixées sur les lamelles avec 1 ml de paraformaldéhyde 4 % pendant 10 minutes avant d'être à nouveau rincées 3 x avec 1 ml de PBS. Leurs membranes sont alors perméabilisées avec 2 ml de Triton X-100 1 % pendant 5 minutes afin de permettre l'entrée de l'anticorps dans les cellules. On décante et on réalise ensuite le marquage spécifique des cellules en les incubant en présence d'anticorps primaires pendant 2 heures à température ambiante et en chambre humide. Le système de la chambre humide permet d'utiliser moins d'anticorps. Il s'agit d'une grande boîte de Pétri au fond de laquelle on place un filtre humide. On met sur ce filtre autant de morceaux de parafilms qu'il y a de tests. On y dépose une goutte de 50 µl de la solution d'anticorps puis on recouvre d'une lamelle en veillant à ce que les cellules soient du côté de l'anticorps. On ferme ensuite hermétiquement la boîte de Pétri pour éviter toute évaporation. Après avoir rincé les cellules avec 3 x 1 ml de PBS + BSA 3 %, on ajoute alors l'anticorps secondaire pendant 45 minutes à température ambiante en chambre humide et dans l'obscurité. Les cellules sont rincées avec 3 x 1 ml

de PBS + BSA 3 % et une dernière fois avec 1 ml de PBS avant de monter les lamelles dans une goutte de mowiol sur une lame porte-objet. Le tout est placé à 4° C dans l'obscurité pendant 24 heures pour permettre la polymérisation. Si les lames ne sont pas observées après ces 24 heures, elles sont conservées à – 20°C jusqu'à leur observation au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Allemagne).



# **Résultats et Discussion**

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, nous avons mené différentes expériences dans le but de déterminer si l'hypoxie pouvait induire l'apoptose et de caractériser cette apoptose. Ensuite, dans un second temps, nous avons essayé de montrer si l'activation ou l'inhibition du facteur de transcription HIF-1 pouvait moduler l'induction de l'apoptose. Pour toutes les expériences, nous avons également utilisé du TNF- $\alpha$ , comme contrôle positif d'induction de l'apoptose.

#### A) Caractérisation de l'apoptose

##### 1. Mise au point des conditions expérimentales

Afin de mettre au point des conditions expérimentales dans lesquelles l'hypoxie pouvait induire de l'apoptose, nous avons utilisé trois types cellulaires différents c'est-à-dire les cellules L929 (fibroblastes de rat), COS-7 (cellules de rein de singe) et HepG2 (hépatome humain) et incubé ces cellules pendant des temps croissants sous hypoxie.

Le premier jour, les cellules sont repiquées dans des boîtes de culture appropriées c'est-à-dire soit des T75 soit des plaques multi-puits. Ensuite, les cellules sont incubées 24 heures dans leur milieu respectif enrichi de 10% de sérum fœtal de veau. Après cette incubation, le milieu est décanté et on ajoute ensuite du milieu ne contenant que 0,5 % de sérum. De nouveau les cellules sont incubées à 37°C mais pendant un laps de temps plus court (5 à 6 heures). Cette incubation a pour but de mettre au repos les cellules afin d'éteindre au maximum les différentes voies de transduction du signal allumées par les constituants du sérum (facteurs de croissance, cytokines, ...). Ce protocole est appliqué aux cellules avant chaque expérience. Ensuite, on soumet les cellules à différents temps d'hypoxie au terme desquels, le nombre de cellules en apoptose ou en nécrose est compté grâce à la technique de la



coloration à l'annexine V. Des cellules contrôles sont incubées en parallèle en normoxie.

Cinq temps d'hypoxie ont été testés : 2h, 6h, 18h, 24h et 36h et le nombre de cellules en apoptose a été évalué.

	<b>HepG2</b>	<b>L929</b>	<b>COS-7</b>
<b>2 heures</b>	Hyp = Norm	Hyp = Norm	
<b>6 heures</b>	Hyp = Norm	Hyp = Norm	
<b>18 heures</b>	Hyp > Norm	Hyp > Norm	Mortes
<b>24 heures</b>	Hyp > Norm	Hyp > Norm (15% de nécrose)	Mortes
<b>36 heures</b>	NT	Mortes	NT

**Figure 1 : Mise au point des conditions expérimentales d'incubation sous hypoxie.**

Les cellules ont été incubées pendant des temps croissants en normoxie (Norm) ou en hypoxie (Hyp). Au terme de ces incubations, le nombre de cellules en apoptose a été déterminé par coloration à l'annexine V. (NT = Non Testé)

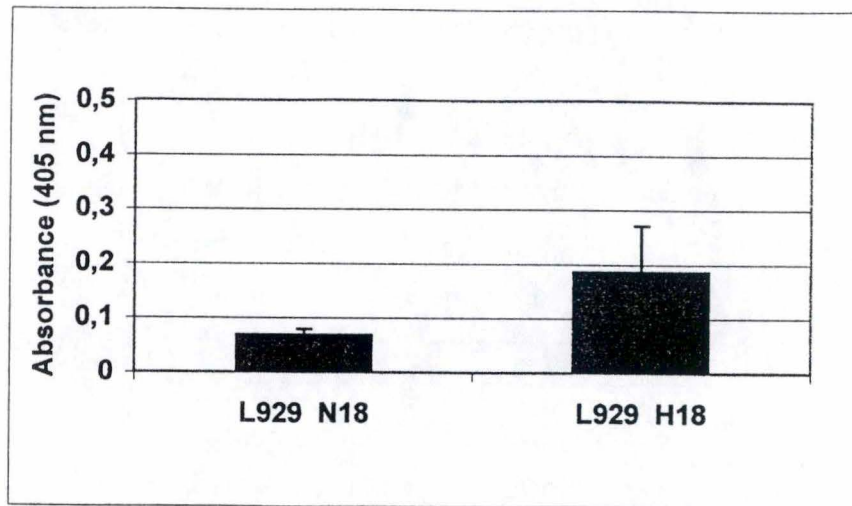
Pour les cellules L929, on remarque qu'il faut au moins un temps d'hypoxie de 18 heures pour que l'on observe une augmentation du nombre de cellules en apoptose en hypoxie par rapport à la normoxie. Par contre, si on augmente le temps d'hypoxie jusqu'à 36 heures, on remarque que toutes les cellules L929 sont mortes.

Ces mêmes observations peuvent être faites pour les cellules HepG2. Avant un temps d'hypoxie de 18 heures, on ne remarque pas d'augmentation du nombre de cellules en apoptose.

Par contre, en ce qui concerne les cellules COS-7, un temps d'hypoxie de 18 heures entraîne la mort de toutes les cellules. Pour tenter d'observer des cellules en apoptose, il faudra diminuer le temps d'hypoxie. Une seconde expérience a montré qu'à 8 heures, on pouvait observer des cellules COS-7 en apoptose en hypoxie mais pas en normoxie.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi deux conditions expérimentales différentes :

- un temps d'hypoxie de 18 heures pour les cellules L929.
- un temps d'hypoxie de 8 heures pour les cellules COS-7.

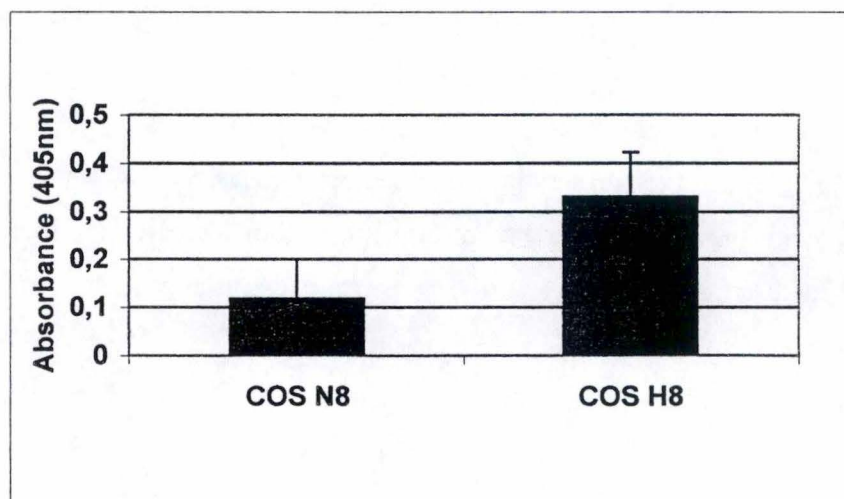


**Figure 2 : Effet de l'hypoxie sur les cellules L929.**

La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type ( $n = 3$ ).

L929 N18 : Cellules L929 incubées dans 1,5 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 18 heures en normoxie.

L929 H18 : Cellules L929 incubées dans 1,5 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 18 heures en hypoxie.



**Figure 3 : Effet de l'hypoxie sur les cellules COS-7.**

La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type ( $n = 3$ ).

COS-7 N8 : Cellules COS-7 incubées dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 8 heures en normoxie.

COS-7 H8 : Cellules COS-7 incubées dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 8 heures en hypoxie.



Les cellules L929 sont bien décrites dans la littérature pour l'étude des processus d'apoptose, notamment induite par le TNF- $\alpha$ . De plus, elles sont faciles à cultiver. Les cellules COS-7, quant à elles, ont été beaucoup étudiées par D. Mottet lors de son mémoire : l'activation du facteur de transcription HIF-1 y est bien connue. Par ailleurs, il a mis au point une technique de transfection efficace pour ces cellules.

Par ailleurs, nous avons décidé de ne pas continuer avec les cellules HepG2. En effet, elles sont plus difficiles à cultiver que les deux autres et comme nous avons déjà deux types cellulaires, cela nous paraissait suffisant pour poursuivre le travail.

## 2. Caractérisation de l'apoptose

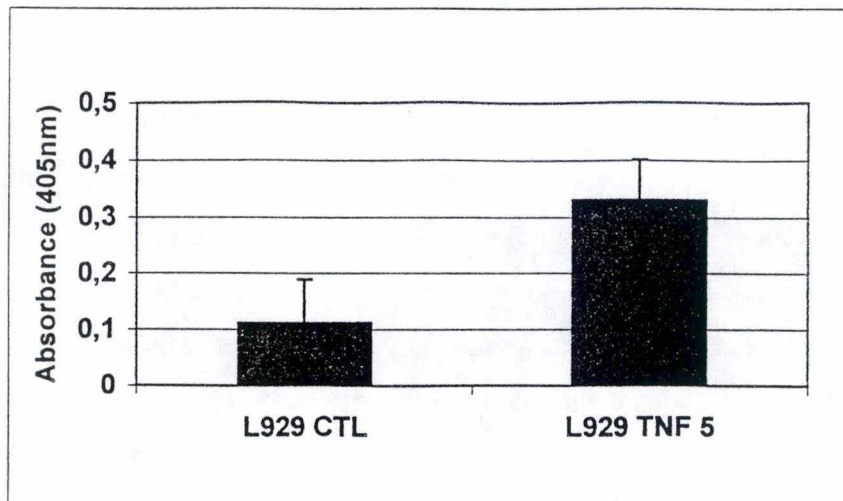
Les premiers résultats préliminaires suggèrent que dans les conditions expérimentales d'hypoxie choisies, on observe des cellules en apoptose. Nous avons voulu par la suite caractériser plus précisément cette apoptose. L'effet du TNF- $\alpha$  sur l'apoptose cellulaire sera toujours étudié en parallèle ; il nous servira de contrôle positif car le TNF- $\alpha$  est bien connu pour induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires dont les cellules L929 (Trent *et al*, 1996)

### *A. Fragmentation de l'ADN*

La fragmentation de l'ADN est une caractéristique typique des cellules en apoptose. Cette fragmentation peut être quantifiée en mesurant le taux de nucléosomes non sédimentables présent dans le lysat des cellules grâce à un système ELISA.

#### 1. Effet de l'hypoxie

##### a) Résultats (figures 2 et 3)

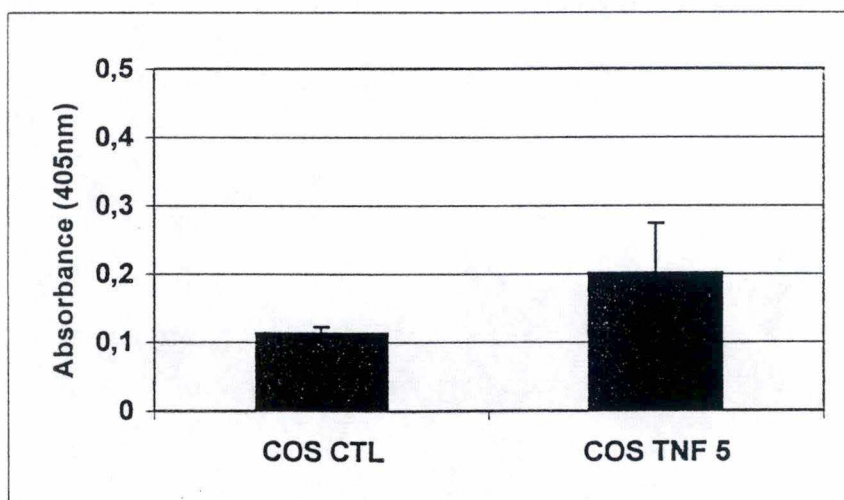


**Figure 4 : Effet du TNF- $\alpha$  sur les cellules L929.**

La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type ( $n = 3$ ).

L929 CTL : Cellules L929 incubées dans 2 ml de milieu DHG + 0,5 % de sérum pendant une durée de 18 heures.

L929 TNF 5 : L929 CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml).



**Figure 5 : Effet du TNF- $\alpha$  sur les cellules COS-7.**

La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type ( $n = 3$ ).

COS-7 CTL : Cellules COS-7 incubées dans 2 ml de milieu DMEM + 0,5 % de sérum pendant une durée de 18 heures.

COS-7 TNF 5 : COS-7 CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml).



Les cellules L929 sont incubées 18 heures en hypoxie et en parallèle 18 heures en normoxie. On peut observer une petite augmentation de la fragmentation de l'ADN dans les cellules en hypoxie par rapport aux cellules en normoxie.

Les cellules COS-7 sont incubées pendant une durée de 8 heures en normoxie et en hypoxie. On peut aussi observer chez ce type cellulaire une petite augmentation de l'apoptose des cellules sont en hypoxie par rapport aux cellules maintenues en normoxie.

#### b) Discussion

Les résultats de cette première expérience suggère que les temps d'hypoxie choisis pour chaque type cellulaire induisent une petite augmentation de l'apoptose par rapport aux cellules maintenues en normoxie. Il faudra des expériences complémentaires pour confirmer ou infirmer cette observation.

### 2. Effet du TNF- $\alpha$

#### a) Résultats (figures 4 et 5)

Quand on incube des cellules L929 avec du TNF- $\alpha$  (5ng/ml), on observe une augmentation du niveau de la fragmentation de l'ADN. Cette observation est aussi valable pour les cellules COS-7 incubées également avec du TNF- $\alpha$  (5ng/ml) mais cette augmentation semble plus faible que chez les cellules L929.

#### b) Discussion

Le TNF- $\alpha$  semble bien induire l'apoptose chez les cellules L929 et chez les cellules COS-7. Par contre, il semble que ce phénomène soit plus important chez les cellules L929 que chez les cellules COS-7. Pour la suite des expériences, nous avons gardé la concentration de 5ng/ml pour le TNF- $\alpha$ .

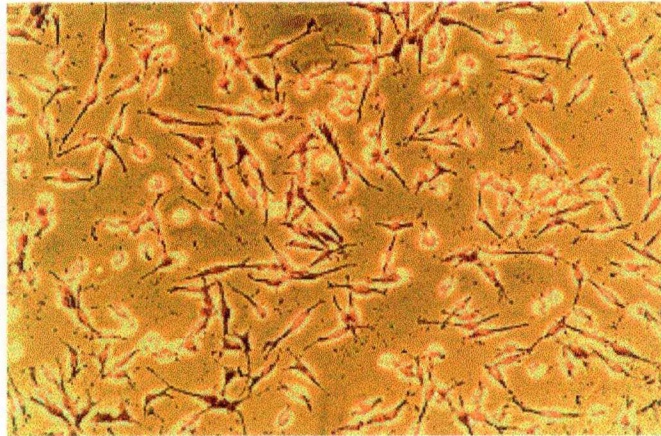


Figure 6 : Cellules L929 marquées grâce  
à la coloration tunel.  
Ces cellules ont été incubées 18 heures  
dans un milieu DHG + 0,5 % de sérum  
avant d'être marquées (L929 contrôles).

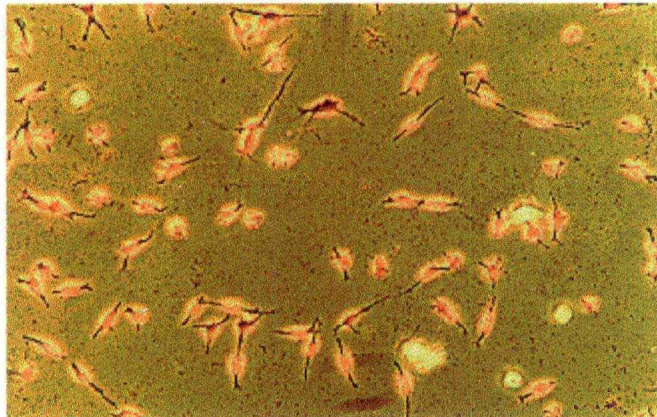


Figure 7 : Cellules L929 marquées grâce  
à la coloration tunel.  
Ces cellules ont été incubées 18 heures  
dans un milieu DHG + 0,5 % de sérum  
+ TNF- $\alpha$  à 5ng/ml avant d'être marquées.



*B. Essais de quantification du nombre de cellules en apoptose*

Nous avons ensuite essayé de déterminer la proportion de cellules en apoptose par rapport à la population totale, et ce à l'aide de deux techniques différentes et ceci afin de se rendre compte de l'importance de ce phénomène.

1. Coloration tunel

La première de ces deux méthodes est la coloration tunel qui marque en brun le noyau des cellules en apoptose. En effet, lorsque les cellules sont apoptose, on observe une fragmentation de leur ADN. La coloration tunel utilise une enzyme, la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transférase) qui catalyse la polymérisation de nucléotides à l'extrémité libre 3'OH de ces fragments d'ADN. Les nucléotides, ajoutés à cette extrémité 3'OH, sont couplés à la fluorescéine. Si, ensuite, on ajoute des anticorps anti-fluorescéine couplés à une peroxydase, puis le substrat de cette peroxydase, on pourra alors visualiser au microscope optique les cellules en apoptose.

Les cellules sont incubées en hypoxie ou en normoxie pendant 8 heures pour les cellules COS-7 et 18 heures pour les cellules L929. En parallèle, les cellules sont incubées 18 heures dans du milieu contenant 0,5 % de sérum en présence ou en absence de TNF- $\alpha$  à 5ng/ml. Après ces différents traitements, on marque les cellules grâce à la coloration tunnel. Malheureusement, quand on a observé les cellules au microscope optique, toutes les cellules sont apparues marquées et il était impossible de différencier les cellules en apoptose de celles qui ne le sont pas. Si on observe la figure 6 qui représente des cellules L929 contrôles, on peut déjà observer un grand nombre de cellules marquées. Quand on observe la figure 7 qui représente des cellules L929 incubées au TNF- $\alpha$  (5ng/ml), on remarque aussi que beaucoup de cellules sont marquées et il n'est pas évident de distinguer les cellules en apoptose de celles qui ne le sont pas. Par contre, on peut clairement remarquer une différence dans le nombre des cellules entre les deux figures : les cellules incubées au TNF- $\alpha$  sont nettement moins nombreuses que les cellules contrôles.

Nous avons tenté plusieurs mises en point en testant différents temps d'incubation pour le substrat de la peroxydase ainsi que différentes concentrations de

celui-ci ainsi que du conjugué anticorps-peroxydase. Malgré ces différents essais, nous ne sommes pas parvenus à distinguer les cellules apoptotiques des cellules saines : toutes les cellules étaient toujours marquées même dans les contrôles négatifs.

## 2. Coloration à l'Annexine V

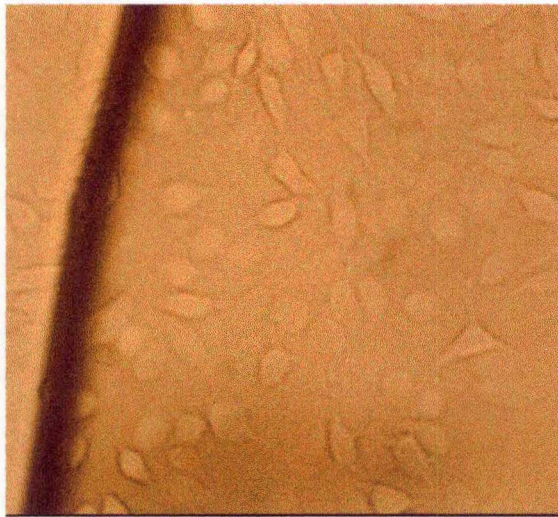
Puisque la coloration tunel ne nous a pas permis de quantifier le nombre de cellules en apoptose, nous avons utilisé une seconde technique : la coloration à l'annexine V.

Les cellules en apoptose présentent au niveau du feuillet externe de leur membrane plasmique des molécules de phosphatidylsérine (PS). Par contre, chez les cellules non apoptotiques, la phosphatidylsérine est uniquement présente dans le feuillet interne. En utilisant l'annexine V, une protéine calcium dépendante montrant une affinité pour la phosphatidylsérine, on pourra donc différencier au microscope à fluorescence les cellules en apoptose par rapport aux cellules qui ne le sont pas, en utilisant une annexine V couplée à la fluorescéine.

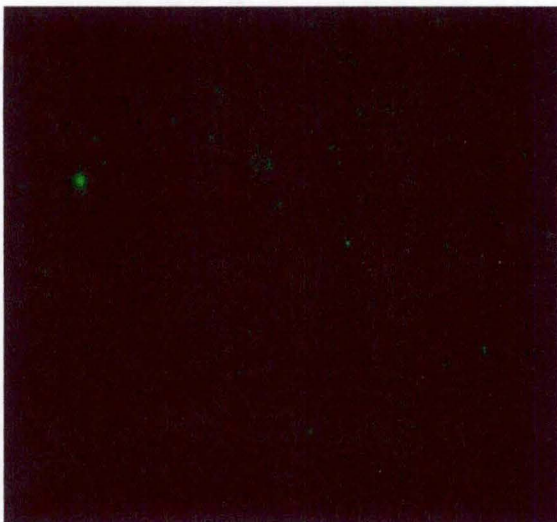
Cependant, les cellules en nécrose présentent, elles aussi, des PS au niveau du feuillet externe de leur membrane plasmique. Afin de différencier les cellules en apoptose des cellules en nécrose, on ajoute l'iodure de propidium qui ne pénètre que dans les cellules en nécrose dont la perméabilité plasmique est perturbée. L'iodure de propidium se fixe à l'ADN des cellules en nécrose et colore leur noyau en rouge. On pourra donc différencier au microscope à fluorescence, en vert les cellules en apoptose et en nécrose et en rouge uniquement les cellules en nécrose.

Les cellules COS-7 et les cellules L929 sont soit incubées sous hypoxie et sous normoxie (8 heures pour les cellules COS-7 et 18 heures pour les cellules L929) soit en présence ou en absence de TNF- $\alpha$  à 5 ng/ml. Au terme de ces incubations, les cellules sont incubées en présence d'annexine V conjuguée à la fluoresceine et d'iodure de propidium et observées au microscope à fluorescence.

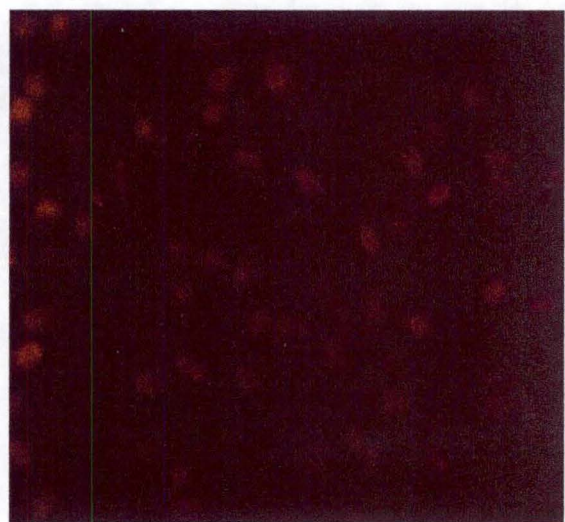




Cellules observées au microscope optique



Cellules en apoptose



Cellules en nécrose

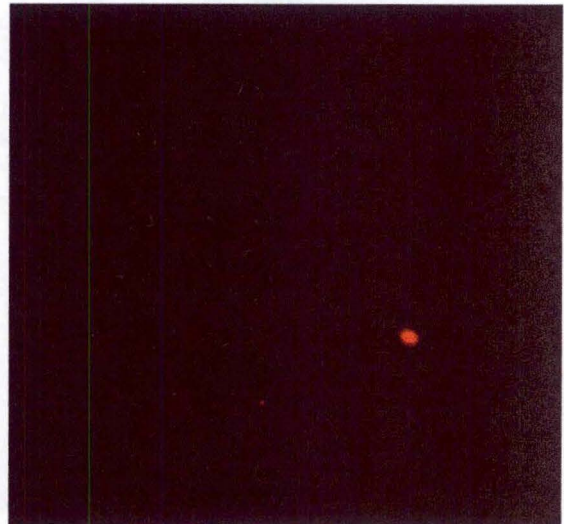
Figure 8A : Coloration à l'annexine V des cellules L929 en normoxie.



Cellules observées au microscope optique



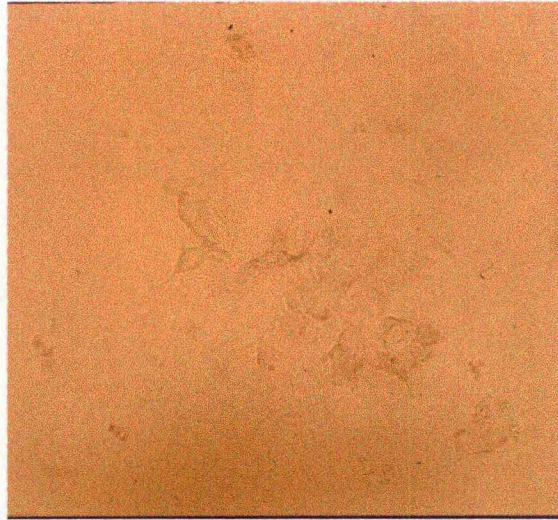
Cellules en apoptose



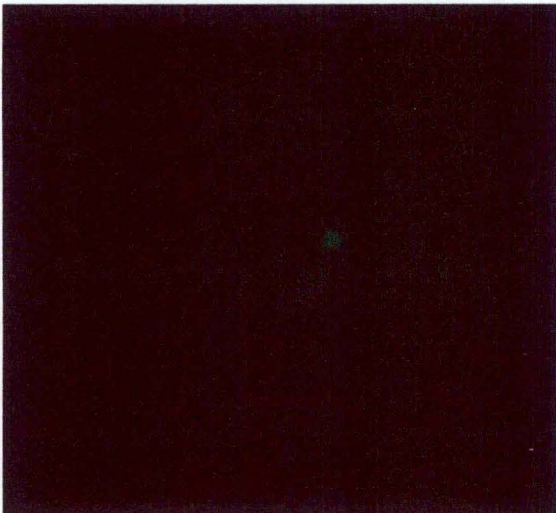
Cellules en nécrose

Figure 8B : Coloration à l'annexine V des cellules L929 en hypoxie.

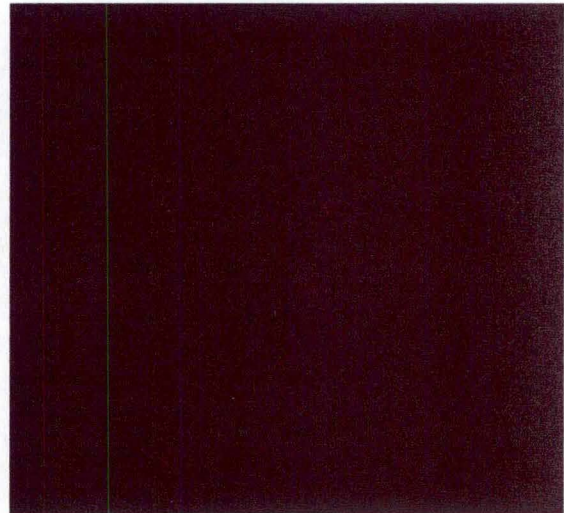




Cellules observées au microscope optique

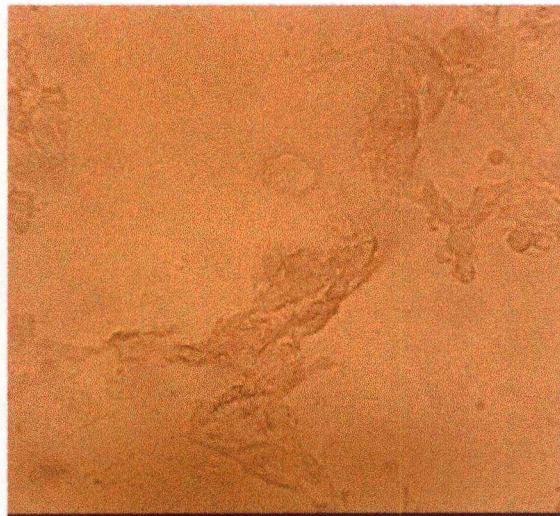


Cellules en apoptose

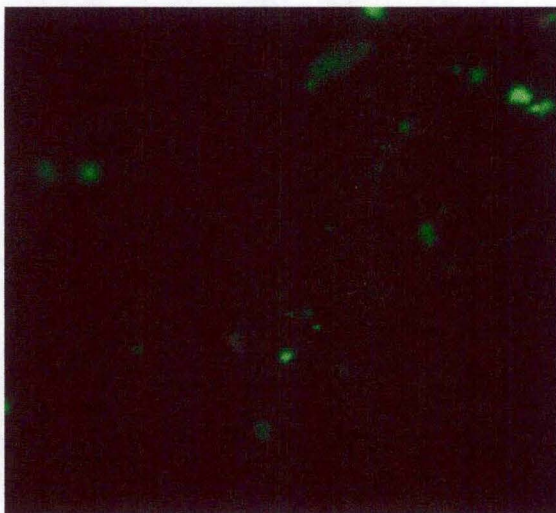


Cellules en nécrose

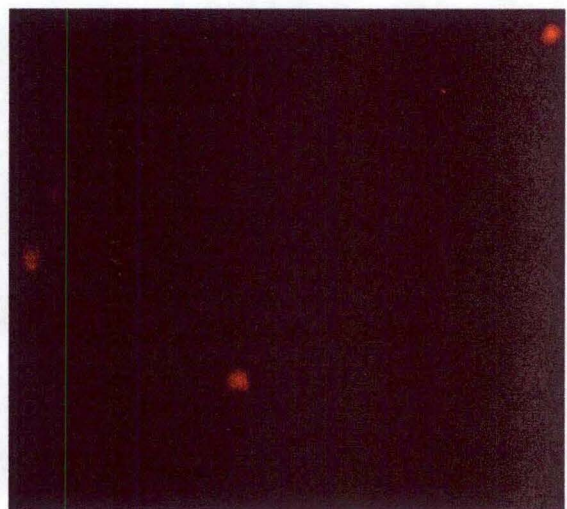
Figure 8C : Coloration à l'annexine V de cellules COS-7 en normoxie.



Cellules observées au microscope optique



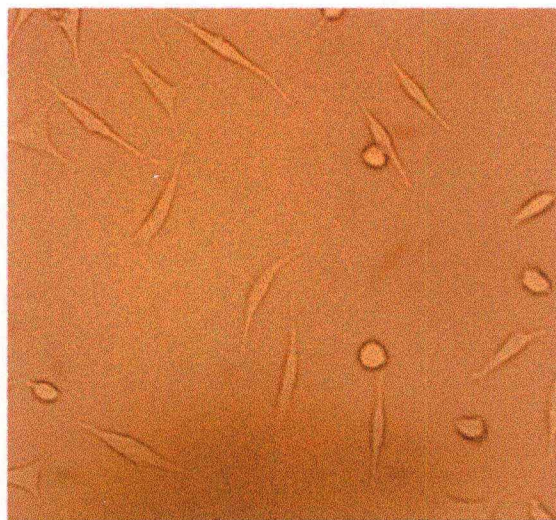
Cellules en apoptose



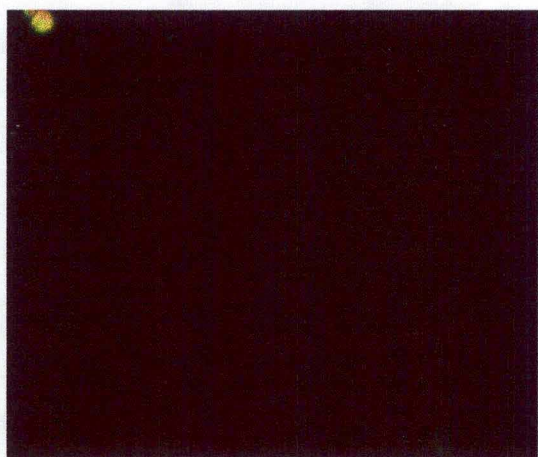
Cellules en nécrose

Figure 8D : Coloration à l'annexine V de cellules COS-7 en hypoxie.

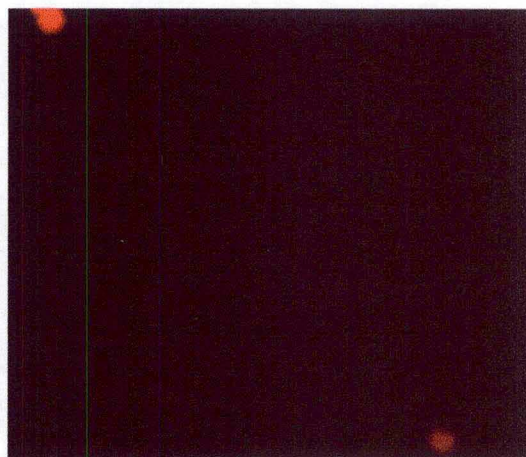




Cellules observées au microscope optique



Cellules en apoptose

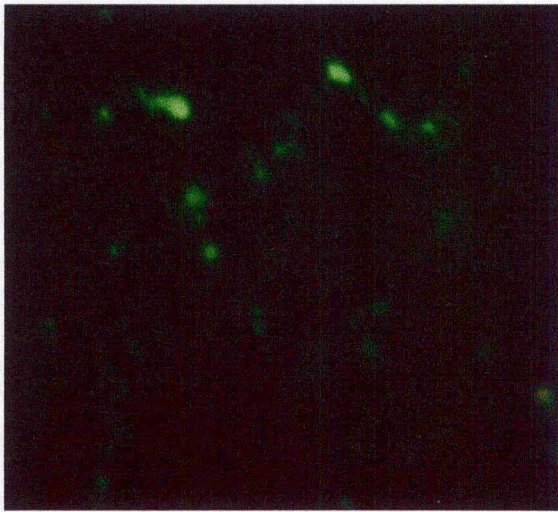


Cellules en nécrose

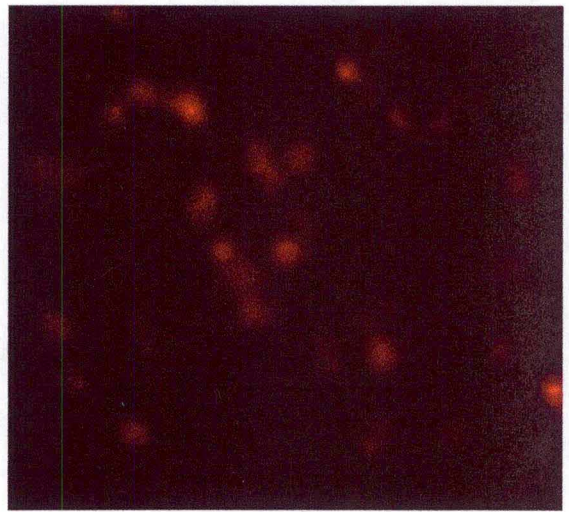
Figure 8E : Coloration à l'annexine V de cellules L929 contrôles.



Cellules observées au microscope optique



Cellules en apoptose



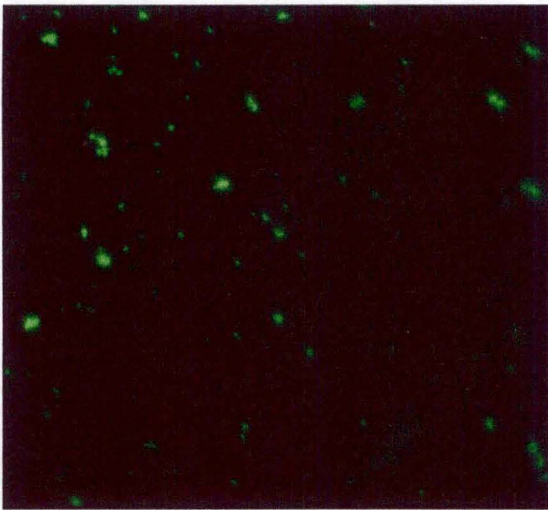
Cellules en nécrose

Figure 8F : Coloration à l'annexine V de cellules L929 incubées 18 heures en présence de  $\text{TNF-}\alpha$ .

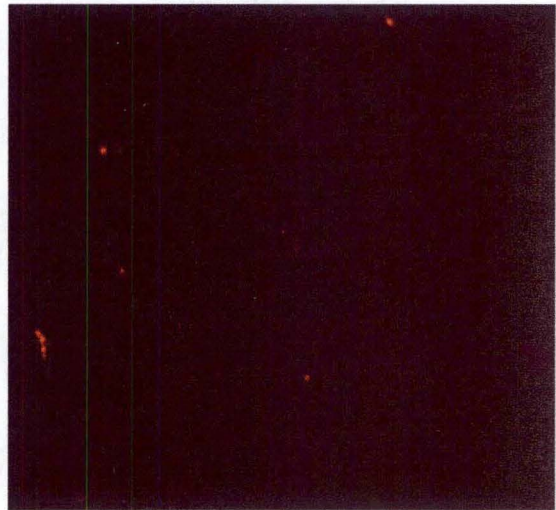




Cellules observées au microscope optique



Cellules en apoptose

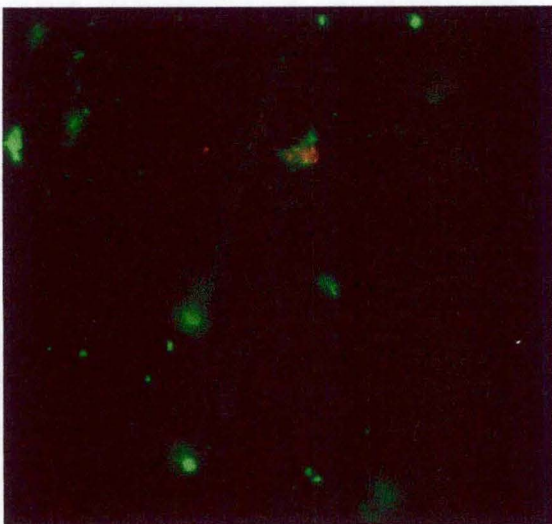


Cellules en nécrose

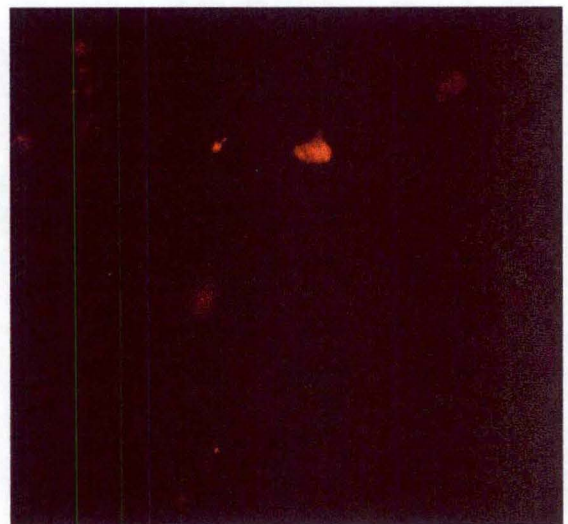
Figure 8G : Coloration à l'annexine V de cellules COS-7 contrôles.



Cellules observées au microscope optique



Cellules en apoptose



Cellules en nécrose

Figure 8H : Coloration à l'annexine V de cellules COS-7 incubées  
18 heures en présence de  $\text{TNF-}\alpha$ .



## Résultats et discussion (figures 8A à 8H)

### 1) Cellules en normoxie et en hypoxie

Pour les cellules L929, on n'observe, en normoxie, aucune cellule en apoptose ni même en nécrose. Par contre, on peut observer par rapport à une population de plus ou moins 45 cellules qui ont subi une hypoxie de 18 heures, une ou deux cellules en apoptose et une cellule en nécrose.

Chez les cellules COS-7 en normoxie, on ne remarque aucune cellule en apoptose ni même en nécrose. Par contre chez les cellules COS-7 en hypoxie, on observe peut-être une cellule en apoptose mais les photos sont difficiles à interpréter car les cellules ont été fort abimées lors du montage.

### 2) Cellules contrôles et cellules incubées avec du TNF- $\alpha$

Chez les cellules L929 contrôles, on observe la présence de une ou deux cellules en nécrose mais aucune cellule en apoptose n'est observée. La population de ces cellules contrôles est de plus ou moins 25 cellules dans un champ du microscope. Pour les cellules incubées en présence de TNF- $\alpha$ , on peut observer trois cellules en nécrose et au moins quatre cellules en apoptose par rapport à une population totale de plus ou moins trente cellules.

Chez les cellules COS-7 contrôles, aucune cellule en apoptose et en nécrose n'est observée. Par contre, ci ces cellules COS-7 sont incubées en présence de TNF- $\alpha$ , on aperçoit une cellule en nécrose et peut-être trois cellules en apoptose.

Même si on peut observer et pour l'hypoxie et pour le TNF- $\alpha$  une augmentation de l'apoptose cellulaire par rapport aux contrôles correspondants, on remarque par cette expérience que ce phénomène ne touche qu'un faible pourcentage de la population totale des cellules sauf peut-être pour les cellules L929 incubées en présence de TNF- $\alpha$ . Ce pourcentage varie entre 5 à 10 % en fonction des conditions.

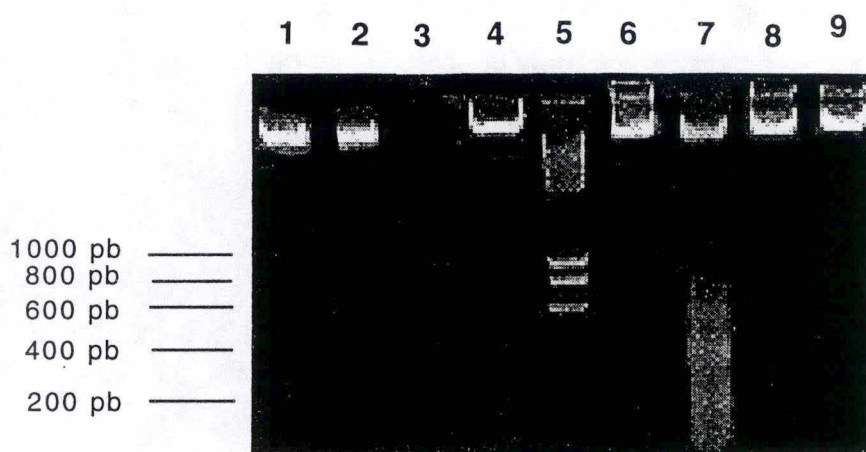


Figure 9 : **DNA LADDER.**

- 1 : Cellules COS-7 contrôle.
- 2 : Cellules COS-7 incubées en présence de TNF- $\alpha$ .
- 3 : Cellules COS-7 après incubation sous normoxie (18H).
- 4 : Cellules COS-7 après incubation sous hypoxie (18H).
- 5 : Marqueur de poids moléculaire.
- 6 : Cellules L929 contrôles.
- 7 : Cellules L929 incubées en présence de TNF- $\alpha$ ;
- 8 : Cellules L929 après incubation sous normoxie (8H)
- 9 : Cellules L929 après incubation sous hypoxie (8H).



### *C. DNA Ladder*

Une des caractéristiques principales des cellules en apoptose est la fragmentation de leur ADN en fragments de 180 pb ou de multiples de 180 pb suite à l'action d'une endonucléase qui coupe l'ADN dans les sites les plus accessibles pour elle, c'est-à-dire entre les nucléosomes. On observera donc sur gel, la présence de tous ces fragments d'ADN sous forme d'une échelle (« ladder »). Pour les cellules non apoptotiques on observe simplement la présence de l'ADN génomique sous forme d'une seule bande qui ne migre pratiquement pas dans le gel.

### Résultats et discussion (Figure 9)

Après les différentes incubations en hypoxie ou en normoxie et en présence ou en absence de  $\text{TNF-}\alpha$ , on isole l'ADN génomique de chaque échantillon cellulaire selon la méthode décrite au point II.12. Après migration sur gel d'agarose, on observe la présence de l'ADN génomique dans chaque puits. D'autre part, les différents fragments d'ADN de 180 pb ou de multiples de 180 pb sont visibles uniquement pour les cellules L929 après incubation en présence de  $\text{TNF-}\alpha$ .

En ce qui concerne l'incubation sous hypoxie, on n'observe pas d'échelle de fragments d'ADN ni pour les cellules L929 ni pour les cellules COS-7. Cette expérience a été réalisée deux fois avec des résultats similaires. La proportion de cellules en apoptose, s'il y en a, n'est probablement pas suffisante que pour pouvoir les détecter par cette technique. Des résultats similaires sont obtenus pour les cellules COS-7 incubées en présence de  $\text{TNF-}\alpha$ . Seules les cellules L929 incubées avec cette cytokine présentent une fragmentation claire de l'ADN.

### *D. Implication des caspases*

Les résultats des expériences précédentes semblent indiquer que l'hypoxie et le  $\text{TNF-}\alpha$  pourraient induire respectivement faiblement et plus fortement de l'apoptose chez les cellules L929 mais peut-être faiblement chez les cellules COS-7. Pour vérifier

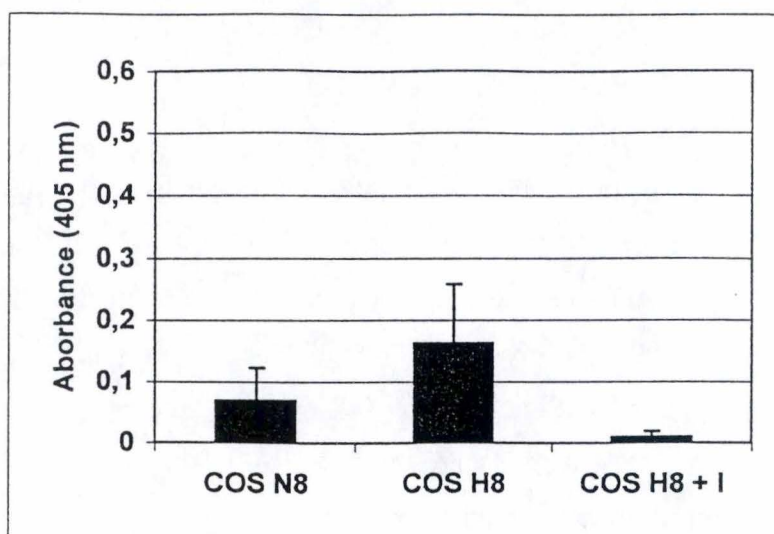


Figure 10 : **Effet de l'inhibiteur de caspases Z-V-A-D fmK sur l'apoptose des cellules COS-7.**

La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type (n = 3).

COS-7 N8 : Cellules COS-7 incubées dans 1ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 8 heures en normoxie.

COS-7 H8 : Cellules COS-7 incubées dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 8 heures en hypoxie.

COS-7 H8 + I : COS-7 H8 + inhibiteur Z-V-A-D fmK (50μM).

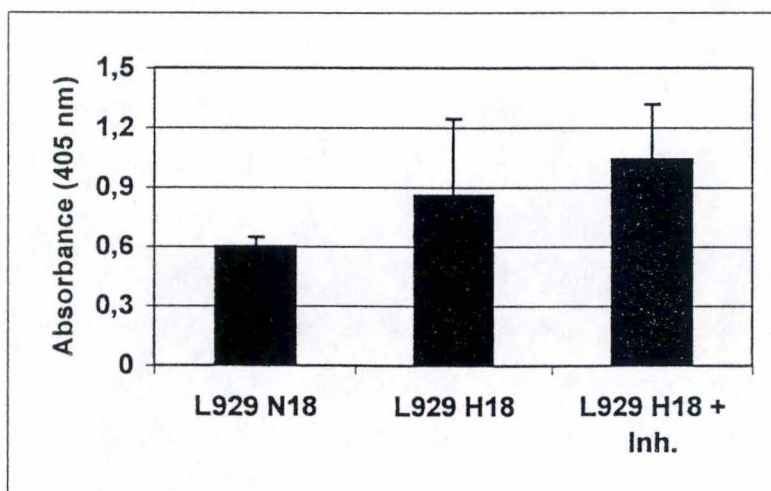


Figure 11 : **Effet de l'inhibiteur de caspases Z-V-A-D fmK sur l'apoptose des cellules L929.**

La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type (n = 3).

L929 N18 : Cellules L929 incubées dans 1,5 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 18 heures en normoxie.

L929 H18 : Cellules L929 incubées dans 1,5 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant pendant 18 heures en hypoxie.

L929 H18 + Inh. : L929 H18 + inhibiteur Z-V-A-D fmK (50μM).



si ce phénomène est bien de l'apoptose, nous avons utilisé un inhibiteur général des caspases, le Z-V-A-D-fmk. Ce peptide bloque le site actif des différentes caspases. Nous avons incubé les cellules en présence ou en absence de cet inhibiteur dans les différentes conditions utilisées précédemment et suivi la fragmentation de l'ADN par ELISA. La concentration finale de l'inhibiteur est de 50  $\mu$ M.

### 1. Effet de l'inhibiteur de caspases sur les cellules en hypoxie (figures 10 et 11)

#### Résultats et discussion

Lorsque les cellules COS-7 sont soumises à l'hypoxie, on observe une petite augmentation de la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules maintenues en normoxie. Lorsque l'inhibiteur de caspases est ajouté dans le milieu de ces cellules en hypoxie, on observe une diminution de cette fragmentation.

Pour les cellules L929, on observe également une faible augmentation de l'apoptose si les cellules sont incubées en hypoxie, augmentation qui n'est pas significative. Par contre, pour ce type cellulaire, on n'observe pas de diminution de l'apoptose quand l'inhibiteur est ajouté au milieu de cellules en hypoxie.

Au vu de ces résultats, on peut avancer l'hypothèse que l'hypoxie induit probablement de l'apoptose cellulaire du moins pour le type cellulaire COS-7. Par contre pour les cellules L929, l'hypoxie ne semble pas induire de l'apoptose puisque lorsque l'on ajoute un inhibiteur de caspases aux cellules L929 en hypoxie, le niveau de la fragmentation de l'ADN n'est pas diminué.

### 2 Effet de l'inhibiteur de caspases sur les cellules incubées en présence de TNF- $\alpha$ (figures 12 et 13)

#### Résultats et discussion

Lorsque les cellules COS-7 sont incubées en présence de TNF- $\alpha$ , on observe une augmentation de la fragmentation de l'ADN. Lorsque l'inhibiteur de caspases est ajouté au milieu de ces cellules, on peut remarquer que le taux d'apoptose diminue faiblement. Pour les cellules L929, on observe une nette augmentation de la

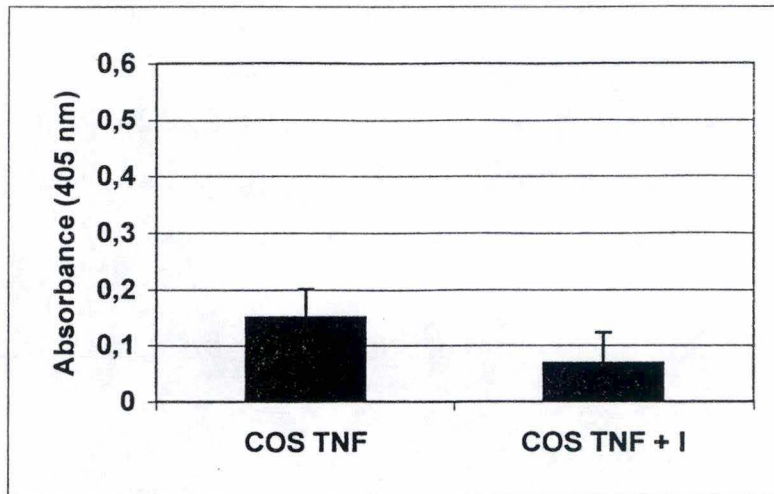


Figure 12 : **Effet de l'inhibiteur de caspases Z-V-A-D fmk sur les cellules COS-7 traitées au TNF- $\alpha$ .**  
La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type ( $n = 3$ ).

COS-7 TNF : COS-7 CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml).

COS-7 TNF + I : COS-7 TNF + inhibiteur Z-V-A-D fmk (50 $\mu$ M).

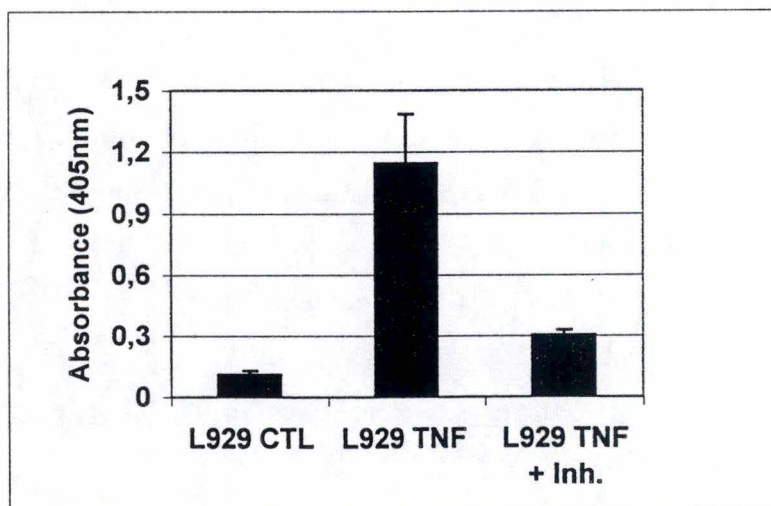


Figure 13 : **Effet de l'inhibiteur de caspases Z-V-A-D fmk sur les cellules L929 traitées au TNF- $\alpha$ .**  
La fragmentation de l'ADN est mesurée grâce à un ELISA. Les résultats sont présentés en tant que moyenne plus ou moins un écart-type ( $n = 3$ ).

L929 CTL : Cellules L929 incubées dans 2 ml de milieu DHG + 0,5 % de sérum pendant une durée de 18 heures.

L929 TNF : L929 CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml).

L929 TNF + Inh. : L929 TNF + inhibiteur Z-V-A-D fmk (50 $\mu$ M).



fragmentation de l'ADN lorsque ces cellules sont incubées en présence de TNF- $\alpha$ . De plus, lorsque l'inhibiteur de caspases est ajouté au milieu de ces cellules, on observe une forte diminution du niveau d'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ .

### Conclusion

L'ensemble des résultats de ces différentes expériences suggèrent que chez les COS-7 l'hypoxie induit faiblement l'apoptose cellulaire. En effet, nous avons montré par la méthode ELISA que le niveau de fragmentation de l'ADN est légèrement plus élevé chez les cellules incubées en hypoxie que chez les cellules maintenues en normoxie. Toutefois, il est difficile de mettre ce phénomène en évidence car il ne touche qu'un faible pourcentage de la population totale des cellules. En effet, lorsque nous avons utilisé la technique de DNA ladder, nous n'avons pas observé chez les cellules en hypoxie l'échelle des fragments d'ADN normalement présente chez les cellules en apoptose. Nous avons vu par la technique de coloration à l'annexine V que l'apoptose ne touche que 5 à 10 % de la population cellulaire totale. Enfin, l'inhibiteur des caspases inhibe la fragmentation de l'ADN induite par l'apoptose chez les cellules COS-7. Par contre, les résultats pour les L929 semblent indiquer que si l'hypoxie induit de l'apoptose, elle est vraiment très faible et à la limite de la détection.

On retrouve dans la littérature différents travaux qui montrent que l'hypoxie seule est capable d'induire modérément de l'apoptose. C'est notamment le cas chez des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine (Li *et al*, 1998). Dans ce cas, plus le temps d'incubation en hypoxie est grand, plus le niveau d'apoptose augmente. Ceci est également observé dans les travaux de Hiroshi *et al* (1994) qui ont étudié l'effet de l'hypoxie sur des cardiomyocytes de rats.

Lorsque le TNF- $\alpha$  est ajouté au milieu des cellules, on observe également une augmentation du niveau d'apoptose chez les cellules. Cependant, ce phénomène est plus marqué chez les cellules L929 que chez les cellules COS-7. En effet, lors de mesure du niveau de fragmentation des cellules incubées au TNF- $\alpha$  par ELISA, on observe un taux plus élevé de la fragmentation de l'ADN des cellules L929 que des

cellules COS-7. De plus, lors de l'expérience de DNA ladder, on observe seulement l'échelle des différents fragments d'ADN chez les cellules L929. Le taux d'apoptose induit par le TNF- $\alpha$  chez les cellules COS-7 semble donc être moins élevé que chez les cellules L929.

Le TNF- $\alpha$  est une molécule bien connue pour induire l'apoptose dans de nombreux types cellulaires. Cependant, bien que les cellules COS-7 puissent effectivement subir le phénomène d'apoptose, par exemple lorsque l'on y surexprime Bax (Kitanaka *et al*, 1997), aucune étude n'est présente dans la littérature qui décrit l'effet de cette molécule sur les cellules COS-7.

Par contre, l'effet du TNF- $\alpha$  sur les cellules L929 est fort étudié. Et bien que certaines études montrent que le TNF- $\alpha$  peut induire dans certaines conditions la nécrose des cellules L929 (Vercammen *et al*, 1997), la plupart des autres travaux décrivent que l'apoptose est la voie principale par laquelle le TNF- $\alpha$  induit la mort des cellules L929 (Kouroku *et al*, 2000 et Trent *et al*, 1996).

### 3. Rôle de protéines pro-apoptotiques

Différentes protéines pro- ou anti- apoptotiques sont impliquées dans l'initiation ou la modulation de l'apoptose. C'est notamment le cas des protéines de la famille Bcl-2 ou de la protéine p53. Dans cette troisième partie de la caractérisation de l'apoptose, nous allons suivre l'expression de deux protéines pro-apoptotiques. Nous avons choisi d'étudier l'expression de Bax et de la protéine p53. Bax fut retenue parce que c'est une protéine pro-apoptotique qui agit au niveau de la mitochondrie dans de nombreux modèles de l'apoptose mais rien n'est décrit quant à son éventuelle régulation dans des conditions d'hypoxie. D'autre part, il nous a semblé intéressant de suivre p53 parce qu'il est connu que son expression peut augmenter en hypoxie (voir point I.4 de l'Introduction).

#### *A. La protéine Bax*

Bax est connue dans la littérature pour être une protéine pro-apoptotique c'est-à-dire une protéine induisant la mort cellulaire par apoptose. Dans les cellules vivantes,



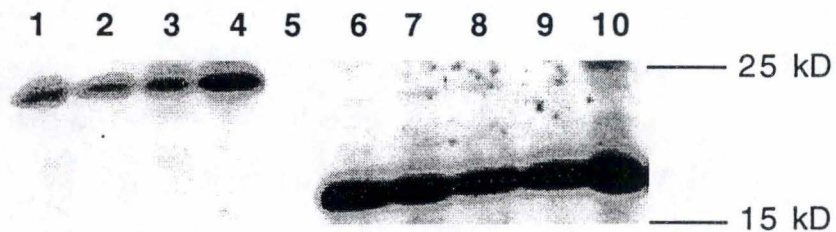


Figure 14 : **Analyse de l'expression de Bax par Western Blot (gel 12 %).**

- 1 : Cellules L929 contrôles.
- 2 : Cellules L929 incubées 18 heures avec du TNF- $\alpha$ .
- 3 : Cellules L929 après incubation sous normoxie (18 heures).
- 4 : Cellules L929 après incubation sous hypoxie (18 heures).
- 5 : Marqueur de poids moléculaire Rainbow.
- 6 : Cellules COS-7 contrôles.
- 7 : Cellules COS-7 incubées 18 heures avec TNF- $\alpha$ .
- 8 : Cellules COS-7 après incubation sous normoxie (8 heures).
- 9 : Cellules COS-7 après incubation sous hypoxie (8 heures).
- 10 : Cellules HepG2 qui servent de contrôle positif.

Bax réside dans le cytosol en tant que monomère inactif. Quand les cellules reçoivent un signal pro-apoptotique, Bax est transloquée dans la mitochondrie et s'intègre dans la membrane sous forme de dimère ou de multimères. Il induirait ainsi la libération du cytochrome c. D'autre part, le gène codant pour la protéine Bax est un des gènes cibles de p53 (Gross *et al*, 1999).

Dans un premier temps, l'expression de la protéine Bax a été estimée par Western Blot dans les différents échantillons cellulaires. Ensuite, on utilisera la technique d'immunofluorescence pour étudier si cette protéine subit un changement de localisation en fonction des différentes incubations que subissent les cellules.

Les cellules COS-7 et L929 sont incubées en hypoxie et en normoxie pendant respectivement 8 heures et 18 heures. D'autre part, ces cellules sont incubées 18 heures en présence ou en absence de TNF- $\alpha$  (5ng/ml)

#### 1. Détection de la présence de Bax par Western Blot

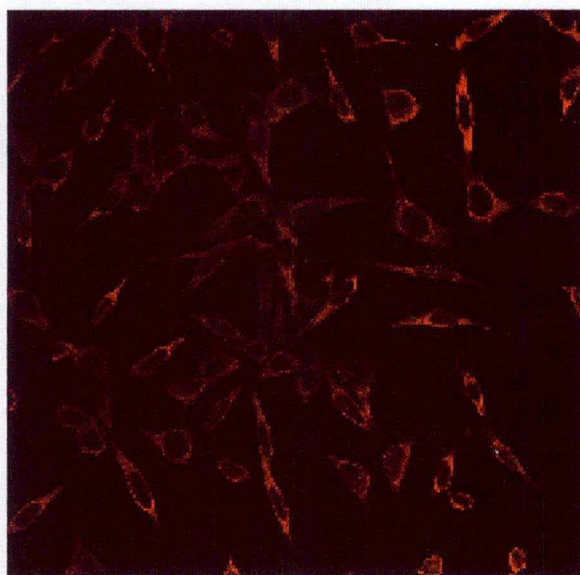
Au terme de ces incubations, les cellules sont lysées et 20  $\mu$ g de protéines de chaque échantillon sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel 12 %. Après transfert, la protéine Bax est détectée grâce à un anticorps spécifique.

#### Résultats et discussion (Figure 14)

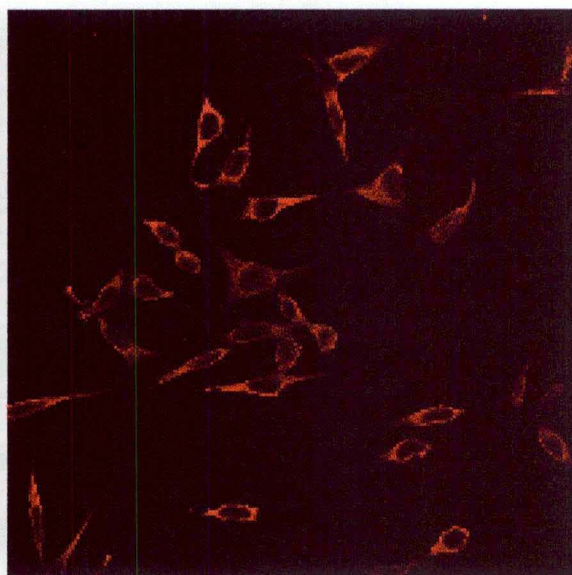
On peut observer sur le film de révélation du Western Blot la présence d'une bande de protéine dont le poids moléculaire se situe entre 15 et 25 kD. Cette bande correspond probablement bien à la protéine Bax puisque celle-ci a un poids moléculaire de 23 kD. Cependant, on observe une bande de taille différente pour les cellules L929 et les cellules COS-7. La protéine Bax possède des isoformes différents. Les résultats du Western Blot suggèrent que ces deux types cellulaires expriment des isoformes différents. On observe une bande dont le poids moléculaire un peu plus élevée chez les cellules L929 qui sont des cellules murines que chez les cellules COS-7 qui sont des cellules de singe. Comme nous avons utilisé un gel 12 %, cette différence de poids moléculaire se marque nettement. La protéine Bax est codée par un gène comprenant 6 exons et montre pattern complexe de splicing alternatif de



A

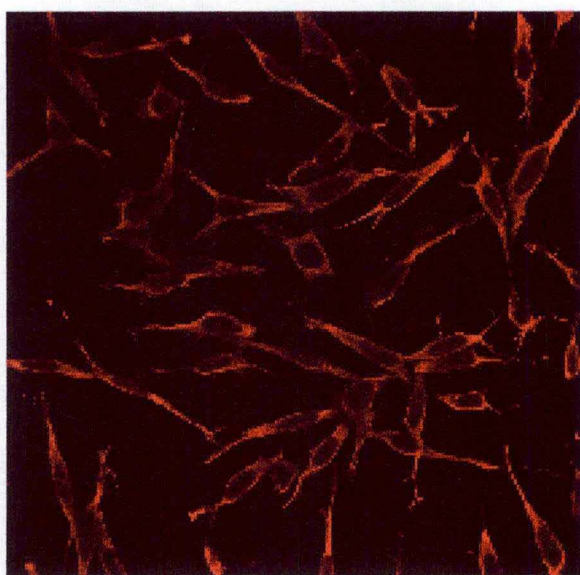


Cellules L929 contrôles

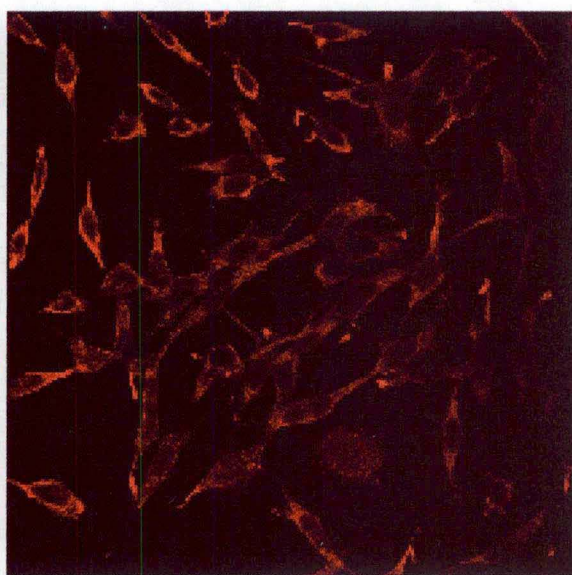


Cellules L929 incubées au TNF- $\alpha$

B



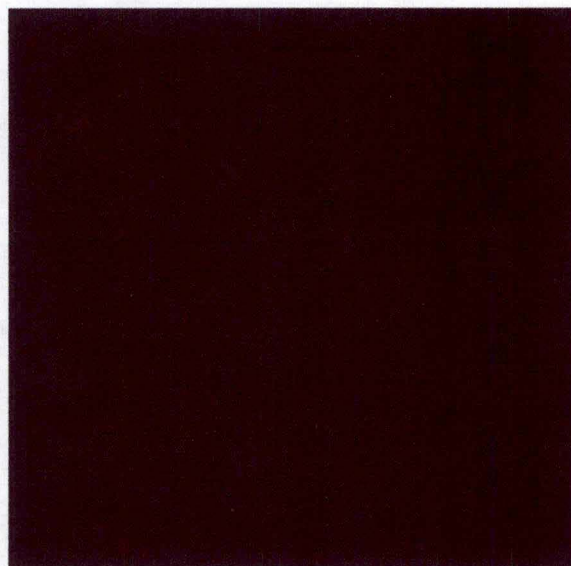
Cellules L929 incubées sous normoxie



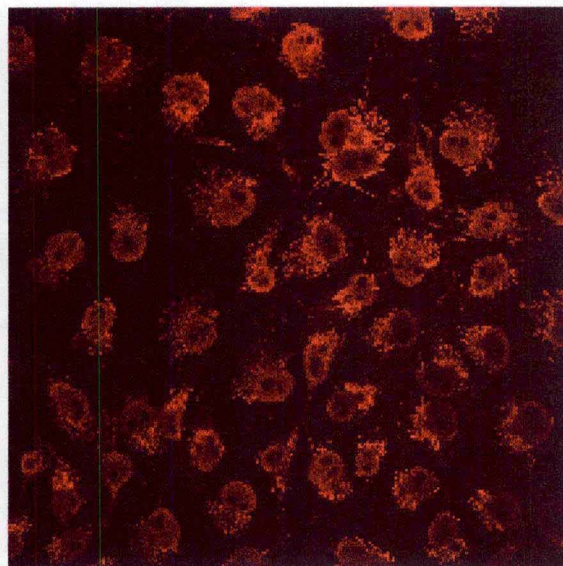
Cellules L929 incubées sous hypoxie

Figure 15 : Immunolocalisation de Bax dans les cellules L929  
(Grossissement 40 X).

A

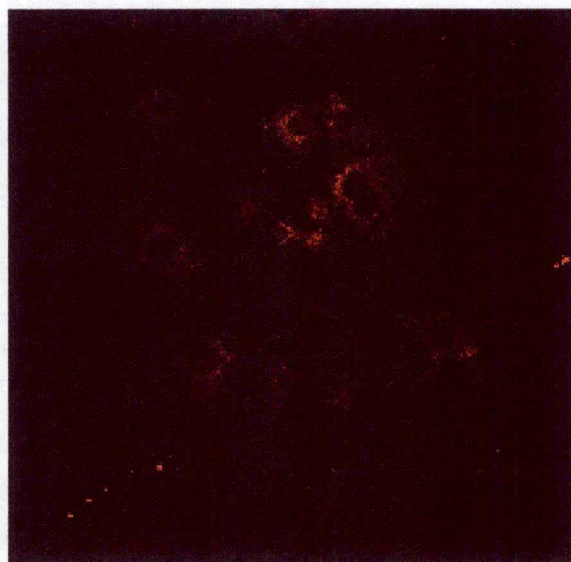


Cellules COS-7 contrôles

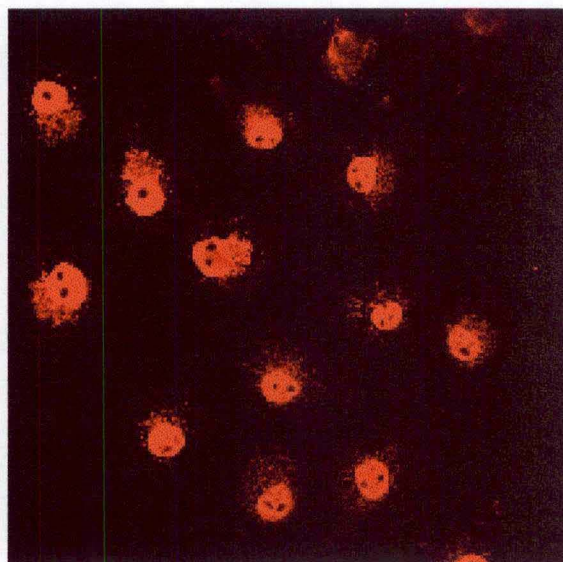


Cellules COS-7 incubées au TNF- $\alpha$

B



Cellules COS-7 incubées sous normoxie



Cellules COS-7 incubées sous hypoxie

Figure 16 : Immunolocalisation de Bax dans les cellules COS-7  
(Grossissement 40 X).



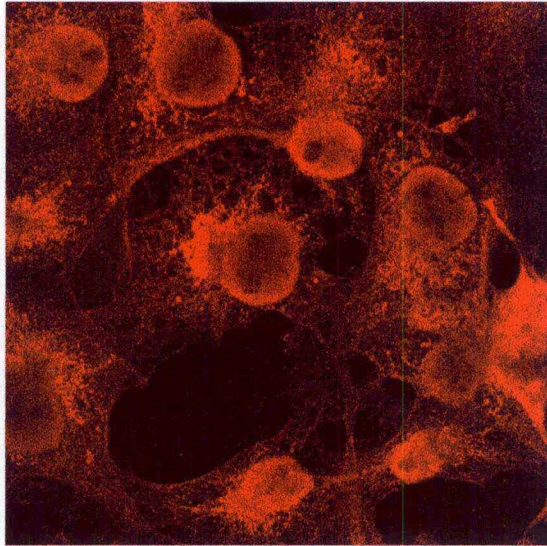


Figure 17 : Immunolocalisation de Bax chez les cellules COS-7 incubées 8 heures en hypoxie (grossissement 100 x).

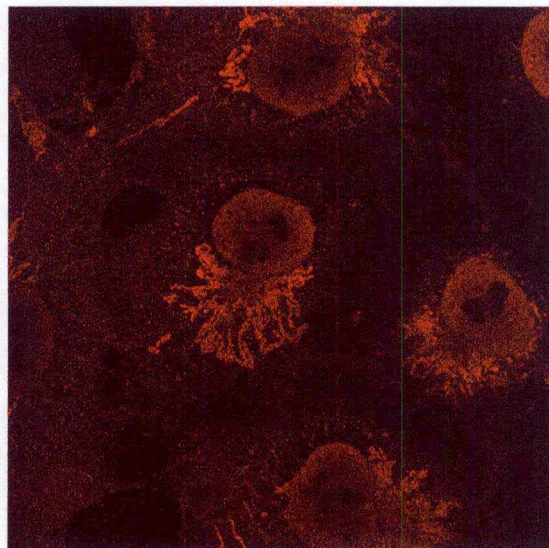


Figure 18 : Immunolocalisation de Bax chez les cellules COS-7 incubées 18 heures avec TNF- $\alpha$  (grossissement 100 x).

son ARNm. On peut obtenir différents isoformes de la protéine Bax : Bax  $\alpha$  avec un poids moléculaire de 20 kD, Bax  $\beta$ , avec un poids moléculaire de 23 kD et enfin la protéine Bax  $\delta$  dont le poids moléculaire est de 5 kD (Oltvai *et al*, 1993). Bax  $\alpha$  est plutôt une protéine membranaire tandis que Bax  $\beta$  et  $\delta$  sont plutôt des protéines cytosoliques (Oltvai *et al*, 1993). Il serait donc possible que les bandes que l'on observe sur le Western Blot correspondent à la protéine Bax  $\beta$  pour les cellules L929 et à la protéine Bax  $\alpha$  pour les cellules COS-7.

En ce qui concerne la quantité de cette protéine, on n'observe pas de variation de celle-ci en fonction des différentes conditions. On remarque seulement que cette protéine est plus abondante chez les cellules COS-7 que chez les cellules L929.

## 2. Observation de la localisation de Bax par immunofluorescence

La localisation subcellulaire des protéines au sein des cellules peut être étudiée grâce à la technique d'immunofluorescence. Pour cela, on utilise un anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée. Ensuite, un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc des anticorps par ailleurs couplé chimiquement à un fluorochrome permet de révéler la protéine. Pour détecter la présence de Bax on utilise d'abord un anticorps primaire de lapin anti-Bax puis un anticorps secondaire Alexa 568 de chèvre anti-IgG de lapin dont le fluorochrome émet dans le rouge.

### a) Cellules en hypoxie et en normoxie (Figures 15 et 16)

Chez les cellules L929, on remarque que Bax se retrouve dans le cytoplasme de ces cellules que celles-ci aient été incubées en conditions d'hypoxie ou de normoxie.

Par contre, pour les cellules COS-7, on retrouve un peu de Bax dans les mitochondries des cellules en normoxie tandis que dans les cellules en hypoxie, Bax est présent dans les mitochondries et dans le noyau et ce, en grande quantité (Figure 17).



b) Cellules contrôles et cellules incubées avec TNF- $\alpha$ .

Chez les cellules L929, on retrouve toujours Bax dans le cytoplasme de ces cellules que celles-ci aient été incubées en présence ou en absence de TNF- $\alpha$ .

Chez les cellules COS-7, Bax n'est pas visible chez les cellules contrôles tandis que si les cellules sont incubées en présence de TNF- $\alpha$ , on retrouve Bax en abondance dans les mitochondries et en petite quantité dans le noyau (Figure 18).

Si la localisation de Bax ne change pas en fonctions des conditions expérimentales dans les cellules L929, cette protéine, dans les cellules COS-7 est par contre transloquée préférentiellement dans le noyau en hypoxie et préférentiellement dans les mitochondries suite à une incubation en présence de TNF- $\alpha$ .

*B. La protéine p53*

La protéine p53 est présente dans toutes les cellules mais en faible quantité car elle continuellement dégradée. On observe cependant une augmentation de la quantité de cette protéine lorsque la cellule présente des dommages génomiques. En effet, lorsque la cellule présente des dommages à son ADN, la protéine p53, qui est activée et stabilisée, peut avoir deux rôles. Dans un premier temps, p53 agit comme un facteur de transcription qui active l'expression d'un gène qui code pour la protéine p21 qui elle-même inhibe la kinase cycline dépendante contrôlant la progression de la cellule dans le cycle cellulaire. La cellule est donc arrêtée dans son cycle cellaire et ne peut plus se diviser jusqu'à ce que son ADN soit réparé. p53 permet ainsi de limiter la division de cellules dont l'intégrité génomique est perturbée et permet aussi de limiter les risques d'apparition de cellules tumorales. Si l'ADN est réparé, la cellule pourra alors recommencer à se diviser. Par contre, si l'ADN reste endommagé, p53 conduit la cellule vers le processus d'apoptose en activant la transcription de gènes codant pour des protéines telles que Bax, Fas ... qui sont des molécules pro-apoptotiques.

Dans un premier temps, nous avons déterminé par Western Blot l'expression de la protéine p53 dans les deux types cellulaires en fonction des conditions

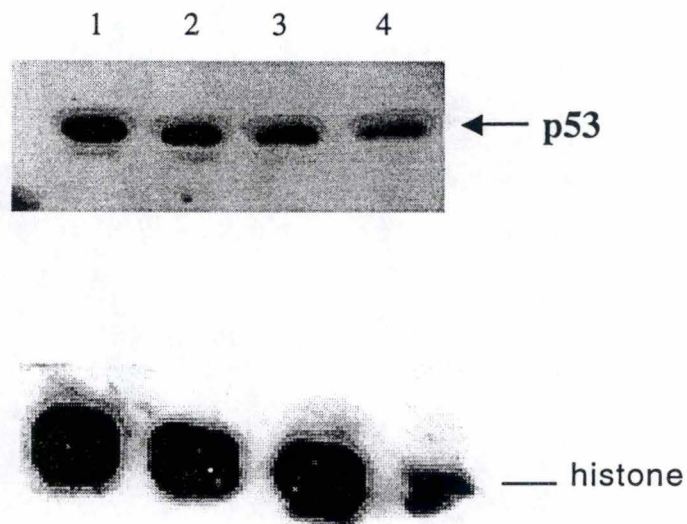


Figure 19 : Analyse de l'expression de p53 par Western Blot (gel 10%).

- 1 : Cellules COS-7 incubées 18 heures en présence de  $\text{TNF-}\alpha$
- 2 : Cellules COS-7 contrôles
- 3 : Cellules COS-7 après incubation de 8 heures sous hypoxie
- 4 : Cellules COS-7 après incubation de 8 heures sous normoxie



d'incubation. Ensuite, la localisation subcellulaire de cette protéine a été étudiée par immunofluorescence.

Les cellules L929 et COS-7 sont incubées sous hypoxie et sous normoxie : 18 heures pour les cellules L929 et 8 heures pour les cellules COS-7.

D'autre part, ces cellules ont été incubées en présence ou en absence de TNF- $\alpha$  pendant une durée de 18 heures.

### 1.Détection de la protéine p53 par Western Blot

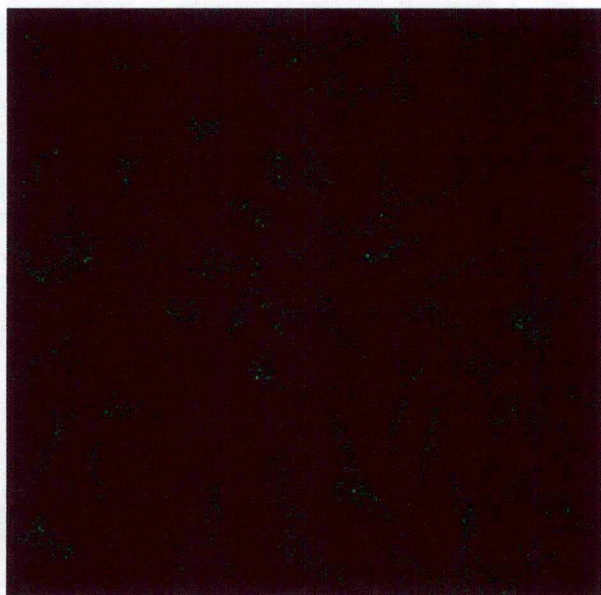
Au terme de ces incubations, les cellules sont lysées et 20  $\mu$ g de protéines de chaque échantillon sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel 10 %. Après transfert, la protéine p53 est détectée grâce à un anticorps spécifique.

### Résultats et discussion (Figure 19)

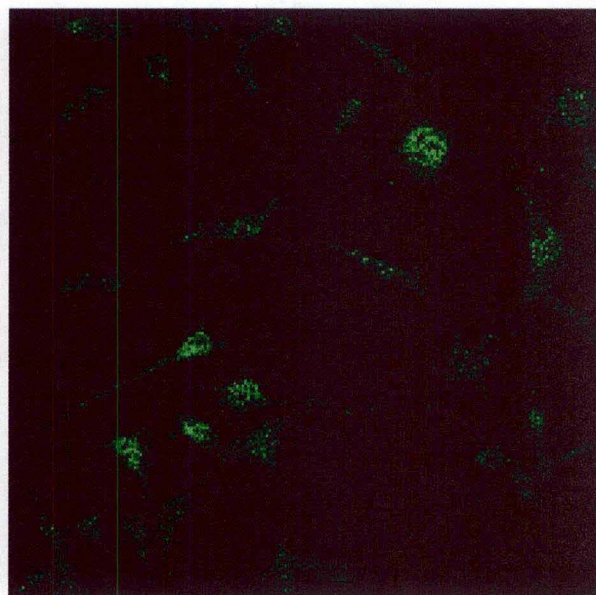
On peut observer sur le film de révélation du Western Blot, une bande qui est uniquement présente pour les cellules COS-7. Cette bande de protéine a un poids moléculaire qui se situe aux alentours de 50 kD, ce qui correspondrait donc bien à la protéine p53. Si on peut observer une variation de l'intensité des bandes présentent pour les cellules COS-7, on ne peut cependant pas en conclure que p53 est présent en plus grande quantité dans certaines cellules puisque si on réalise un contrôle avec la protéine histone, qui normalement est présente dans toutes les cellules dans les mêmes proportions, on observe également une même variation dans l'intensité des bandes. Les variations observées de l'intensité des différentes bandes de p53 dans les différentes conditions expérimentales ne sont donc dues qu'au fait que les puits n'ont pas tous été chargés avec la même quantité de protéines. Il ne semble donc pas y avoir de changement dans l'expression de p53 en hypoxie ou après incubation avec le TNF- $\alpha$ .

En ce qui concerne les cellules L929, nous n'avons pas observé de bande de protéine à la taille attendue. Pourtant, p53 est normalement présente dans toutes les cellules et l'anticorps utilisé reconnaît la forme murine de la protéine (cfr expérience

A

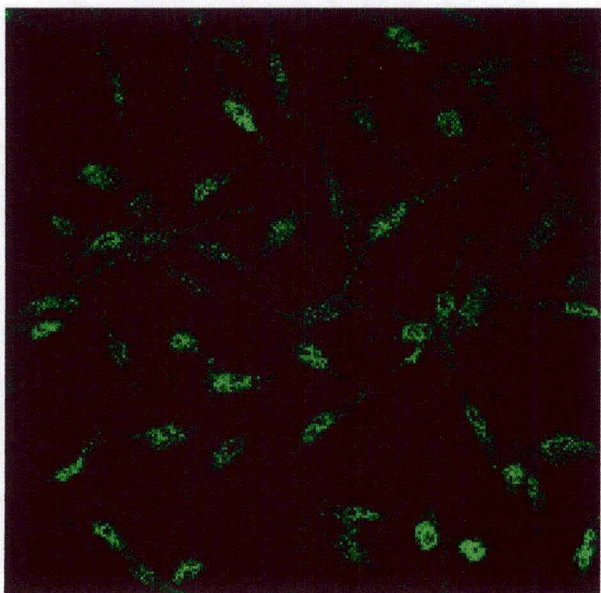


Cellules L929 contrôles

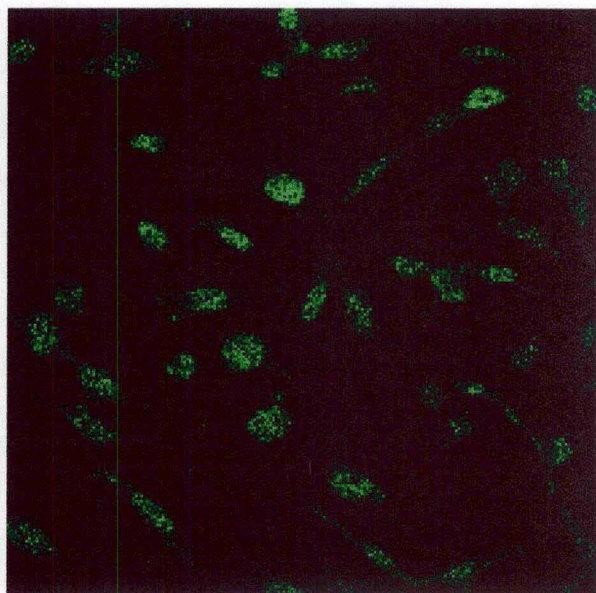


Cellules L929 incubées au TNF- $\alpha$

B



Cellules L929 incubées sous normoxie

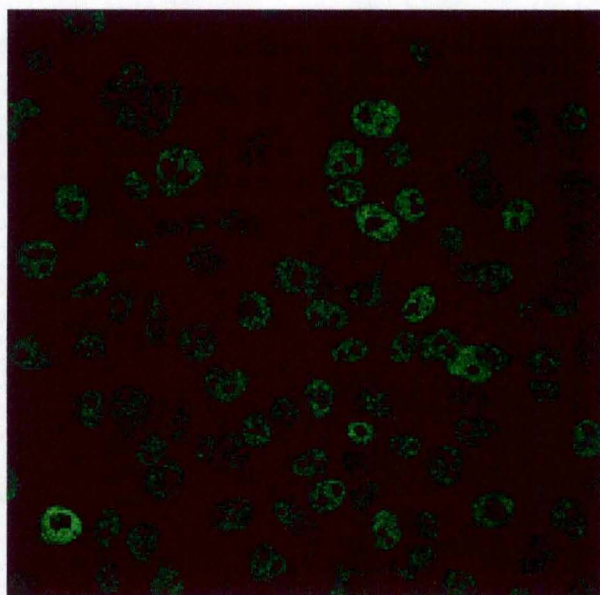


Cellules L929 incubées sous hypoxie

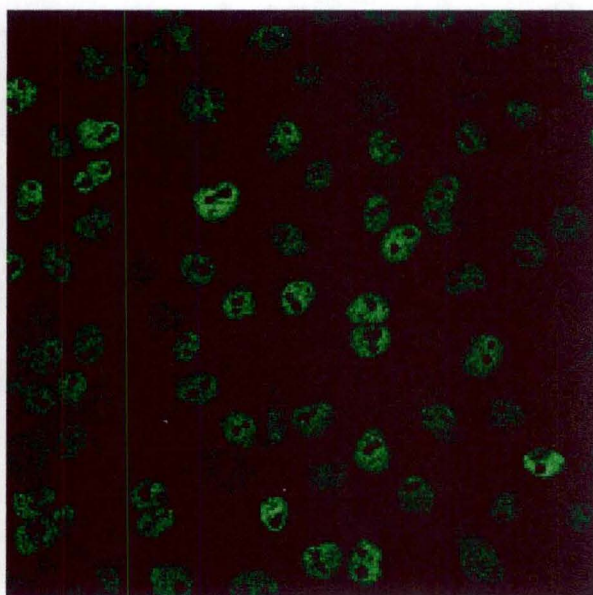
Figure 20 : Immunolocalisation de p53 dans les cellules L929  
(Grossissement 40 X).



A

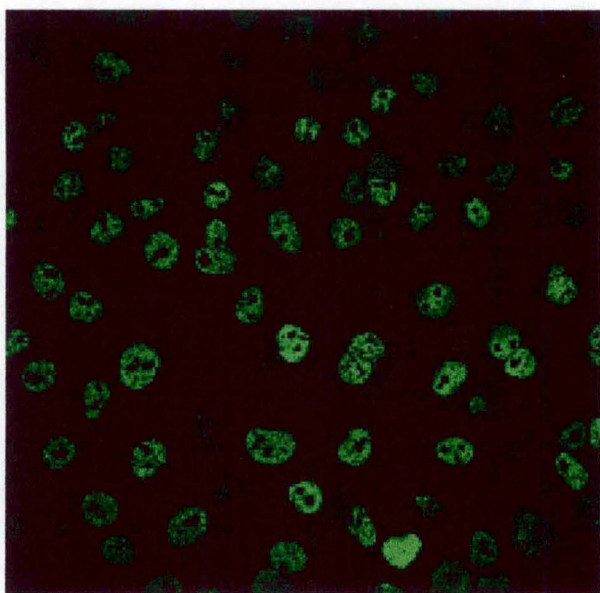


Cellules COS-7 contrôles

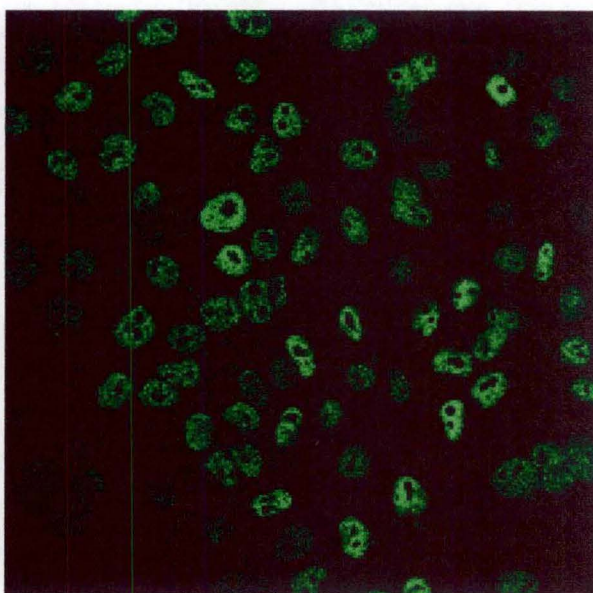


Cellules COS-7 incubées avec TNF- $\alpha$

B



Cellules COS-7 incubées sous normoxie



Cellules COS-7 incubées sous hypoxie

Figure 21 : Immunolocalisation de p53 dans les cellules COS-7  
(Grossissement 40 X).

en immunofluorescence ci-dessous). La quantité de p53 dans ces cellules par rapport aux cellules COS-7 n'est peut-être pas suffisante pour être détectée sur ce film.

## 2. Localisation de la protéine p53 par immunofluorescence

Pour localiser p53, nous avons utilisé d'abord un anticorps de souris anti-p53 avec comme anticorps secondaire l'anticorps Alexa 488 de chèvre anti-IgG de souris qui fluorescence en vert.

### a) Cellules en hypoxie et en normoxie (Figures 20 et 21)

On peut observer chez les cellules L929 que la protéine p53 est présente dans le noyau de ces cellules, que celles-ci aient été incubées en normoxie ou en hypoxie. Seulement, on peut aussi observer des traces de la protéine p53 dans le cytoplasme des cellules.

Chez les cellules COS-7, on observe la localisation de p53 uniquement dans le noyau de ces cellules, que celles-ci aient été incubées en normoxie ou en hypoxie sans différence d'intensité entre les deux conditions expérimentales.

### b) Cellules contrôles et cellules incubées avec du TNF- $\alpha$

Chez les cellules L929, on remarque que la protéine p53 est plus ou moins absente chez les cellules contrôles. Par contre, pour les cellules incubées avec TNF- $\alpha$ , on remarque la présence de p53 essentiellement dans le noyau des cellules mais également en faible quantité dans le cytoplasme.

Chez les cellules COS-7, on peut observer la protéine p53 uniquement dans le noyau des cellules sans différence que celles-ci aient été incubées avec TNF- $\alpha$  ou pas.

## Conclusion

Pris ensemble, ces différents résultats montrent que la protéine Bax est présente dans les deux types cellulaires et que sa quantité ne varie pas en fonction des



différentes conditions expérimentales imposées. En effet, on peut détecter par Western Blot la présence de cette protéine ainsi qu'une expression constante de cette protéine dans les différentes conditions. De manière similaire, Tamatani *et al* (1998) observent lors du déroulement de l'apoptose induite par de l'hypoxie chez des neurones corticaux de rat, une diminution de l'expression de Bcl-2 mais par contre, ils ne remarquent aucune variation de l'expression de la protéine Bax. Ces résultats sont également observés par Stempien-Otero *et al* (1998) sur des cellules endothéliales. Grâce aux expériences d'immunofluorescence, nous avons également observé, chez les cellules COS-7, la translocation de Bax dans le noyau et dans les mitochondries des cellules en hypoxie alors que les cellules maintenues en normoxie montrent une localisation de Bax dans le cytoplasme. Zha *et al* (1996) proposent que la translocation de Bax dans la membrane mitochondriale joue un rôle pro-apoptotique qui est indépendant du niveau d'expression de cette protéine. Par contre, chez les cellules L929 et bien que le TNF- $\alpha$  induise fortement l'apoptose, la protéine Bax est présente uniquement dans le cytoplasme quelles que soient les conditions imposées.

Il faut aussi noter que quand les cellules COS-7 sont incubées avec du TNF- $\alpha$ , on observe la translocation de Bax dans les mitochondries. Il se pourrait donc qu'il existe une gradation quant à la translocation de Bax. Cette protéine pourrait d'abord être transloquée dans les mitochondries puis dans un second temps si le signal apoptotique est plus fort ou si un autre phénomène intervient, dans le noyau des cellules.

En ce qui concerne la protéine p53, nous n'avons pas observé dans les cellules COS-7 de changement quant à sa quantité. De plus, grâce à la technique d'immunofluorescence, nous avons mis en évidence la localisation de p53 dans le noyau des cellules L929 et des cellules COS-7 et ce quelles que soient les conditions imposées. Les travaux de Long *et al* (1997) montrent que p53 pourrait être impliquée dans l'apoptose cellulaire induite par différents stimuli physiologiques, hypoxie incluse. Par ailleurs, l'hypoxie augmente fortement l'expression de p53 (Graeber *et al*, 1994) mais il semblerait que le degré d'hypoxie nécessaire à cette induction soit très sévère (anoxie), beaucoup plus sévère que celui utilisé dans nos conditions expérimentales (Minet *et al*, 1999d), ce qui expliquerait qu'on n'observe pas de changement.

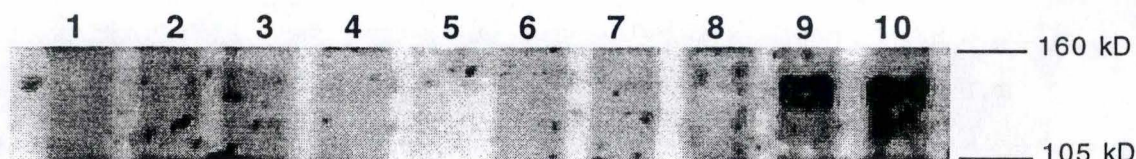


Figure 22 : Analyse de l'expression de HIF-1 $\alpha$  par Western Blot (gel 10 %).

- 1 : Cellules L929 contrôles.
- 2 : Cellules L929 incubées 18 heures en présence de TNF- $\alpha$ .
- 3 : Cellules L929 après 18 heures d'incubation sous normoxie.
- 4 : Cellules L929 après 18 heures d'incubation sous hypoxie.
- 5 : Marqueur de poids moléculaire Rainbow.
- 6 : Cellules COS-7 contrôles.
- 7 : Cellules COS-7 incubées 18 heures en présence de TNF- $\alpha$ .
- 8 : Cellules COS-7 après 8 heures d'incubation sous normoxie.
- 9 : Cellules COS-7 après 8 heures d'incubation sous hypoxie.
- 10 : Cellules HepG2 servant de contrôle positif (incubées 5 heures en hypoxie).



## B. Rôle de HIF-1

Comme nous l'avons mentionné dans l'Introduction, HIF-1 est un facteur de transcription impliqué dans la réponse adaptative des cellules en hypoxie. Cependant, certaines expériences suggèrent qu'il pourrait également être impliqué dans l'induction de l'apoptose en conditions d'hypoxie.

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons donc étudié si le facteur de transcription HIF-1 joue un rôle ou peut moduler l'apoptose induite par l'hypoxie mais également l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ .

### 1. Western Blot

La première chose que nous avons voulu vérifier est la présence de HIF-1 dans les deux types cellulaires étudiés en conditions d'hypoxie par rapport à la normoxie. En effet, la dégradation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  de ce facteur de transcription est inhibée en conditions d'hypoxie et on peut alors observer son accumulation par Western Blot (Kallio *et al*, 1999).

Les deux types cellulaires ont été incubés en hypoxie ou en normoxie respectivement 8 heures pour les cellules COS-7 et 18 heures pour les cellules L929. Après ces incubations, les cellules sont lysées en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases et les protéines de ces extraits sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE. Après transfert, la protéine HIF-1 $\alpha$  est révélée grâce à un anticorps spécifique.

### *Résultats et discussion*

Quand on observe le film de révélation du Western Blot, on remarque la présence d'une protéine correspondant à poids moléculaire d'environ 120kD dans le puits correspondant au contrôle positif (cellules HepG2 incubées 5 heures sous hypoxie) et dans le puits correspondant aux cellules COS-7 qui ont subi une hypoxie de 8 heures (Figure 22). Par contre, on ne retrouve pas cette bande chez les cellules L929 qui ont

pourtant été soumises à une hypoxie de 18 heures. Ce phénomène est dû au fait que l'anticorps anti-HIF1 $\alpha$  utilisé ne reconnaît pas la forme murine de HIF-1 $\alpha$ . Le poids moléculaire de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  étant de 120 kD, on suppose donc que la bande observée correspond bien à HIF-1 $\alpha$ .

Ces résultats suggèrent que l'hypoxie induit bien, du moins chez les cellules COS-7, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et donc l'activation de HIF-1. Celui-ci pourra alors induire la transcription de gènes responsables de l'adaptation des cellules à l'hypoxie.

Sur ce même gel, on a également déposé les extraits cellulaires de cellules COS-7 et L929 incubées en présence ou en absence de TNF- $\alpha$  pendant une durée de 18 heures. Si on observe la présence de HIF-1 $\alpha$  chez les cellules COS-7 en hypoxie, on n'observe par contre aucune trace de celle-ci chez les cellules contrôle ou les cellules traitées au TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  à 5ng/ml pendant 18 heures n'induit donc pas la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ .

## 2. Surexpression de HIF-1 $\alpha$ en transfection transitoire

La première approche que nous avons utilisée pour étudier le rôle de HIF-1 est de surexprimer la sous-unité HIF-1 $\alpha$ . Semenza *et al* (1996) ont en effet montré que la surexpression de HIF-1 $\alpha$  conduisait à une augmentation de l'activité de HIF-1 même en conditions de normoxie.

L'effet de la surexpression de HIF-1 $\alpha$  a été étudiée en suivant la fragmentation de l'ADN, caractéristique de l'apoptose. Dans une première expérience, nous avons transfecté les cellules soit avec un plasmide codant pour HIF-1 $\alpha$  soit avec le plasmide contrôle ne contenant pas l'ADNc de HIF-1 $\alpha$ . Toutes les cellules ont été transfectées à l'aide de l'agent Superfect. Nous avons ensuite incubé celles-ci directement sous hypoxie ou en présence de 5ng/ml de TNF- $\alpha$ . Après ces différentes incubations, nous avons mesuré l'apoptose en suivant la fragmentation de l'ADN par ELISA. Seules les cellules COS-7 ont été utilisées dans cette expérience car l'efficacité de transfection est meilleure pour ces cellules par rapport aux cellules L929.



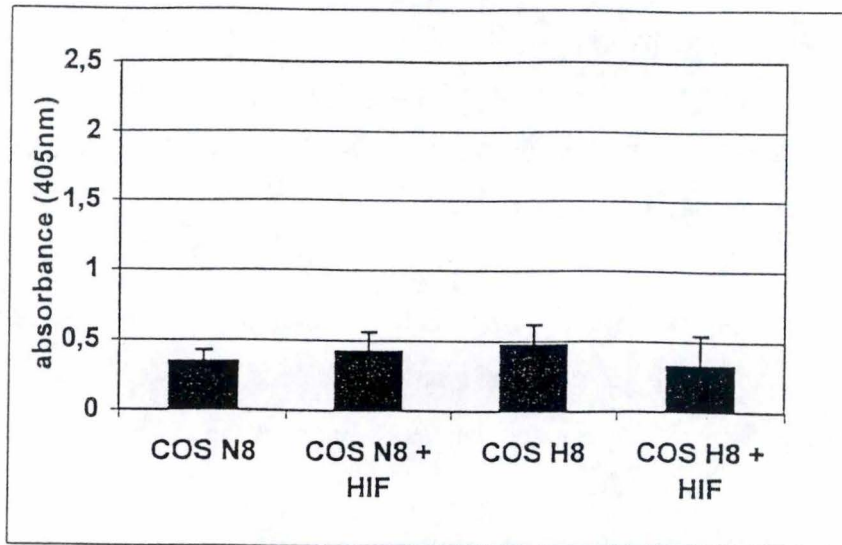


Figure 23 : Effet de la surexpression de HIF-1 sur les cellules COS-7 en hypoxie et normoxie.  
(premier essai de transfection)

COS N8 : Cellules COS-7 incubées 8 heures en normoxie dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant et transfectées avec le plasmide contrôle.  
 COS N8 + HIF : COS N8 transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.  
 COS H8 : Cellules COS-7 incubées 8 heures en hypoxie dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant et transfectées avec le plasmide contrôle.  
 COS H8 + HIF : COS H8 transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

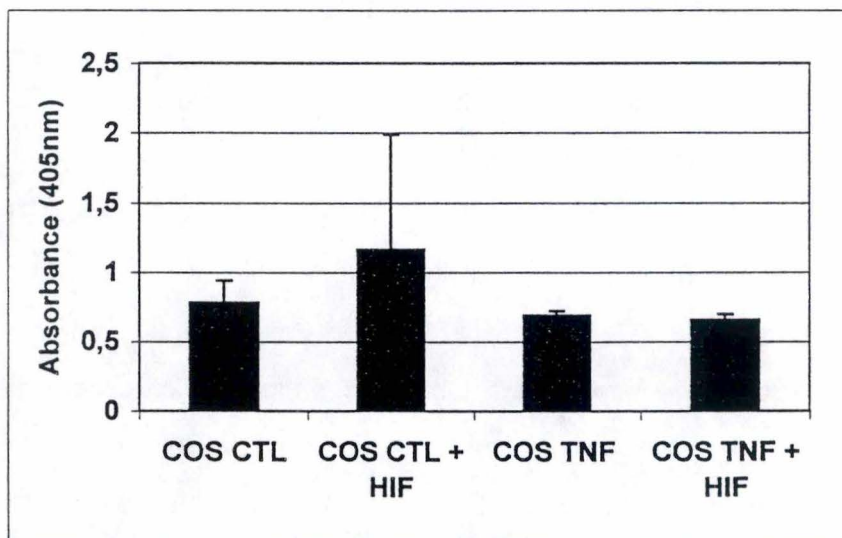


Figure 24 : Effet de la surexpression de HIF-1 sur les cellules COS-7 contrôles et incubées avec du TNF- $\alpha$ .  
(premier essai de transfection)

COS CTL : Cellules COS-7 incubées 18 heures dans 2 ml de milieu DMEM + 0,5% de sérum et transfectées avec le plasmide contrôle.  
 COS CTL + HIF : COS CTL transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.  
 COS TNF : COS CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml) transfectées avec le plasmide contrôle.  
 COS TNF + HIF : COS TNF transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

## Résultats

La figure 23 montre que l'hypoxie n'a pas eu d'effet sur la fragmentation de l'ADN dans cette expérience ; en effet, on n'observe pas, chez les cellules transfectées avec le plasmide contrôle, d'augmentation du niveau de la fragmentation de l'ADN lorsque les cellules sont en hypoxie par rapport aux cellules maintenues en normoxie. Ces observations sont aussi valables pour les cellules transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

De même, lorsque les cellules COS-7 sont incubées en présence de TNF- $\alpha$  (5ng/ml), on n'observe pas non plus d'augmentation du niveau de fragmentation de l'ADN par rapport au niveau des cellules contrôles (Figure 24). Ces observations sont valables et pour les cellules transfectées avec le plasmide contrôle et les cellules transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

Comme ni l'hypoxie ni le TNF- $\alpha$  n'ont induit de fragmentation d'ADN dans cette expérience, une deuxième expérience a été réalisée en changeant le protocole expérimental.

Dans la seconde expérience, on transfecte à nouveau des cellules COS-7 mais aussi des cellules L929. Par contre, les cellules, après avoir été transfectées, sont incubées 24 heures à 37°C dans leur milieu de culture respectif enrichi de 10% de sérum. Cette étape va leur permettre de récupérer après le stress que constitue la transfection par elle-même. Après ce temps de récupération, les cellules sont incubées dans un milieu contenant seulement 0,5 % de sérum pendant six heures et ce, afin d'éteindre au maximum les voies de transduction du signal. Ensuite, les cellules sont incubées en hypoxie et en normoxie ou en présence ou en absence de TNF- $\alpha$  à 5 ng/ml.



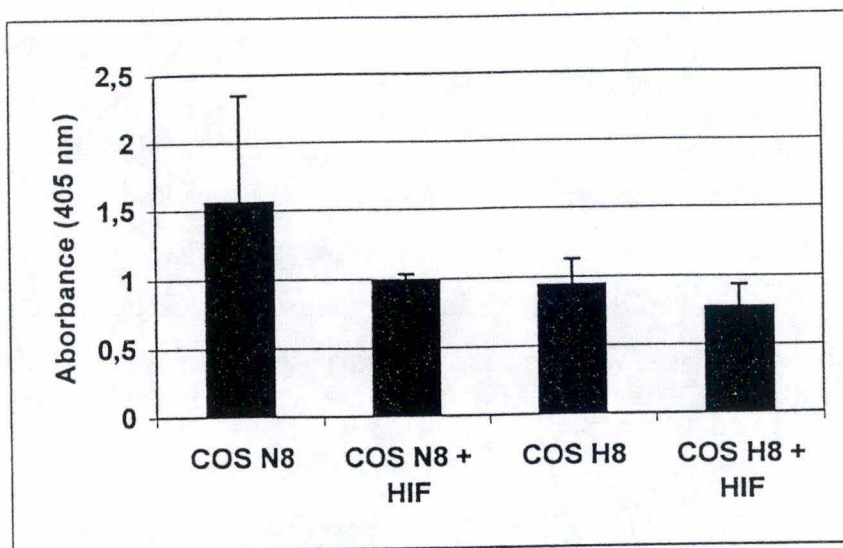


Figure 25 : **Effet de la surexpression de HIF-1 sur les cellules COS-7 en hypoxie et en normoxie.**  
(deuxième essai de transfection)

COS N8 : Cellules COS-7 incubées 8 heures en normoxie dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant et transfectées avec le plasmide contrôle.

COS N8 + HIF : COS N8 transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

COS H8 : Cellules COS-7 incubées 8 heures en hypoxie dans 1 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant et transfectées avec le plasmide contrôle.

COS H8 + HIF : COS H8 transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

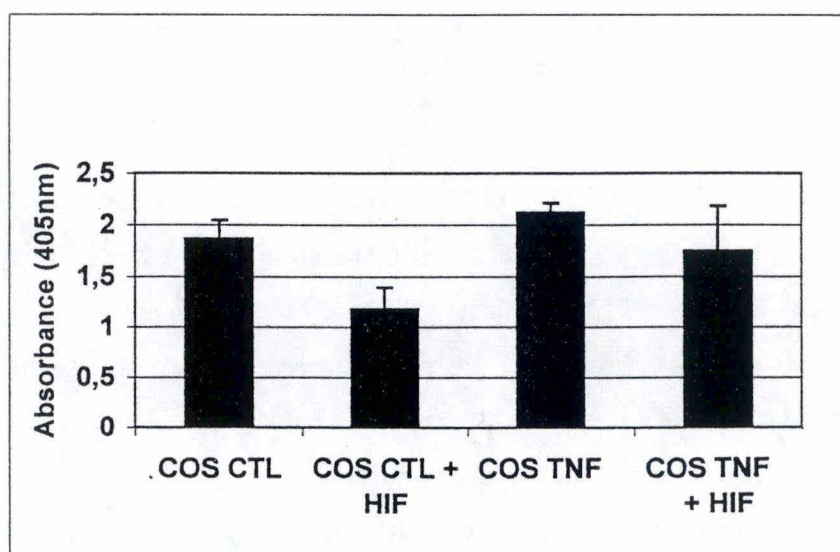


Figure 26 : **Effet de la surexpression de HIF-1 sur les cellules COS-7 contrôles et incubées avec du TNF- $\alpha$ .**  
(deuxième essai de transfection)

COS CTL : Cellules COS-7 incubées 18 heures dans 2 ml de milieu DMEM + 0,5% de sérum et transfectées avec le plasmide contrôle.

COS CTL + HIF : COS CTL transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

COS TNF : COS CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml) transfectées avec le plasmide contrôle.

COS TNF + HIF : COS TNF transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

## Résultats

### 1) transfection puis incubation sous hypoxie

A nouveau, comme dans l'expérience précédente, on n'observe pas d'augmentation de la fragmentation d'ADN induite par l'hypoxie que ce soit pour les cellules COS-7 (Figure 25) ou pour les cellules L929 (Figure 27).

Par contre lorsque HIF-1 est surexprimé, on retrouve trois fois sur quatre une petite diminution de l'apoptose cellulaire sauf dans le cas des cellules L929 incubées sous hypoxie.

### 2) transfection puis incubation en présence de TNF- $\alpha$

De même, le TNF- $\alpha$  n'induit pas de fragmentation de l'ADN plus importante par rapport aux cellules contrôles (Figures 26 et 28). Cependant, les valeurs de ces cellules contrôles sont très élevées par rapport aux valeurs des expériences précédentes.

Le fait que ni l'hypoxie, ni le TNF- $\alpha$  n'induit d'apoptose dans ces expériences pourrait s'expliquer par le fait que la transfection constitue en elle-même un traumatisme ou du moins un stress pour les cellules. Cette transfection pourrait alors augmenter le taux basal d'apoptose cellulaire et donc inhiber l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  ou par l'hypoxie. Si c'est effectivement le cas, il faudrait créer des transfectants stables pour pouvoir étudier l'effet de la surexpression de HIF-1 $\alpha$  sur l'induction de l'apoptose.

## 3.Activation ou induction de HIF-1

Comme les expériences de surexpression de HIF-1 $\alpha$  par transfection ne semblent pas être compatibles avec l'induction de l'apoptose, nous avons essayé de stimuler ou



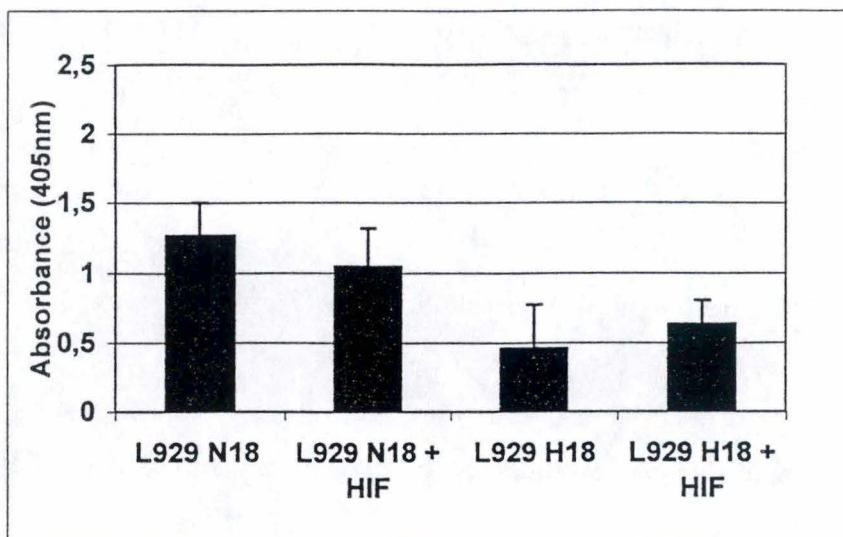


Figure 27 : Effet de la surexpression de HIF-1 sur les cellules L929 en hypoxie et en normoxie. (deuxième essai de transfection)

L929 N18 : cellules L929 incubées 18 heures sous normoxie dans 2 ml de milieu CO<sub>2</sub> indépendant et transfectées avec le plasmide contrôle.

L929 N18 + HIF : L929 N18 transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

L929 H18 : cellules L929 incubées 18 heures sous hypoxie dans 2 ml de milieu CO<sub>2</sub> Indépendant et transfectées avec le plasmide contrôle.

L929 H18 + HIF-1 : L929 H18 transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

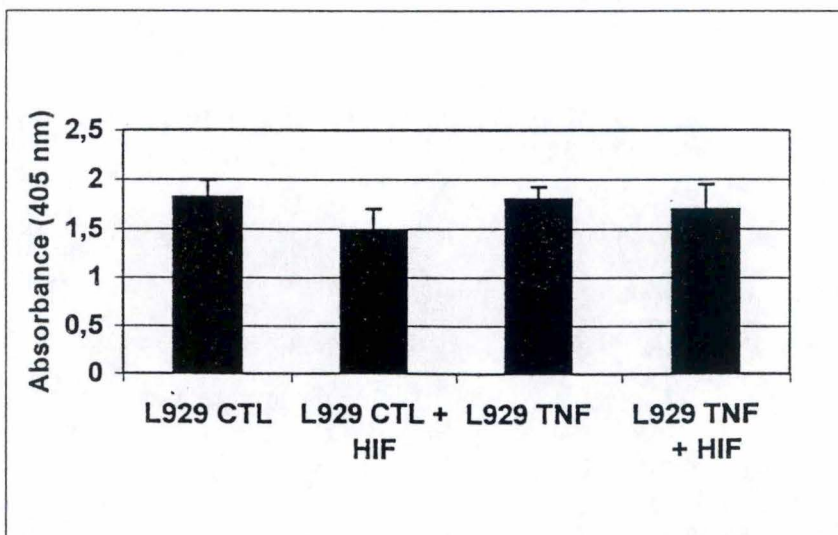


Figure 28 : Effet de la surexpression de HIF-1 sur les cellules L929 contrôle et incubées avec du TNF- $\alpha$ . (deuxième essai de transfection)

L929 CTL : cellules L929 incubées 18 heures dans 2ml de milieu DHG + 0,5 % de sérum et transfectées avec le plasmide contrôle.

L929 CTL + HIF : L929 CTL transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

L929 TNF : L929 CTL + TNF- $\alpha$  (5 $\mu$ g/ml) transfectées avec le plasmide contrôle.

L929 TNF + HIF : L929 TNF transfectées avec l'ADNc codant pour HIF-1.

d'inhiber l'activation du facteur de transcription HIF-1 par un autre moyen c'est-à-dire en utilisant des molécules chimiques.

La lactacystine et le chlorure de cobalt à des concentrations finales respectives de 100 nM et de 150  $\mu$ M ont été utilisées pour augmenter l'expression de HIF-1. D'autre part, la geldanamycine à une concentration finale de 2nM fut employée pour inhiber l'activation de HIF-1.

Comment la lactacystine induit-elle l'activation de HIF-1 ? La lactacystine est un inhibiteur spécifique du protéasome 26S. En conditions de normoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est polyubiquitinée et dégradée rapidement par le protéasome. Par contre, lorsque la cellule est en condition d'hypoxie, le protéasome ne dégrade plus HIF-1 $\alpha$  car celle-ci n'est plus ubiquitinée et elle peut alors être transloquée dans le noyau et se lier à ARNT et former HIF-1. En utilisant la lactacystine qui inhibe l'activité du protéasome, on produit dans la cellule une accumulation de la protéine HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 est alors activé (Kallio *et al*, 1999).

Le chlorure de cobalt induit, lui aussi, l'activation du facteur de transcription HIF-1. Celui-ci induit, entre autre, la transcription du gène codant pour EPO en augmentant surtout l'activité DNA-binding de HIF-1 (Semenza, 1999). Le cobalt prendrait la place du fer dans le senseur à oxygène en le bloquant dans sa forme deoxy mimant ainsi l'hypoxie.

La geldanamycine est un inhibiteur spécifique de Hsp90. L'interaction de HIF-1 $\alpha$  avec Hsp90 est nécessaire pour son repliement et pour son « activabilité » par l'hypoxie. Si on inhibe Hsp90, HIF-1 n'est plus activé par l'hypoxie.

Ces molécules chimiques seront ajoutées juste avant l'incubation des cellules COS-7 et des cellules L929 en présence ou en absence de TNF- $\alpha$ .

### Résultats et discussion (Figures 29-30-31)

La fragmentation de l'ADN augmente nettement quand les cellules sont incubées en présence de TNF- $\alpha$  par rapport au niveau d'apoptose des cellules contrôles que ce soit pour les cellules COS-7 ou pour les cellules L929.

Lorsque la lactacystine est ajoutée en plus du TNF- $\alpha$  dans le milieu des cellules, on observe pour les deux types cellulaires une diminution de l'induction de



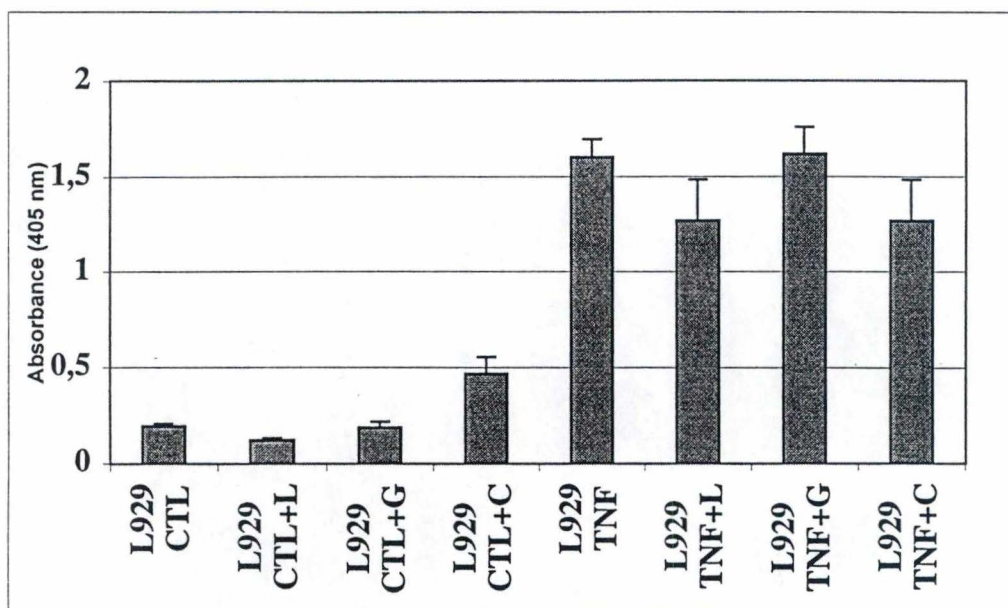


Figure 30 : **Effet de différentes molécules chimiques sur l'apoptose des cellules L929 (premier essai).**

CTL : cellules L929 incubées 18 heures avec milieu DHG + 0,5% de sérum.

CTL + L : CTL + lactacystine à une cc finale de 10 $\mu$ M.

CTL + G : CTL + geldanamycine à une cc finale de 2nM.

CTL + C : CTL + chlorure de cobalt à une cc finale de 150  $\mu$ M.

TNF : CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml)

TNF + L : TNF + lactacystine à une cc finale de 10 $\mu$ M.

TNF + G : TNF + geldanamycine à une cc finale de 2nM.

TNF + C : TNF + chlorure de cobalt à une cc finale de 150 $\mu$ .

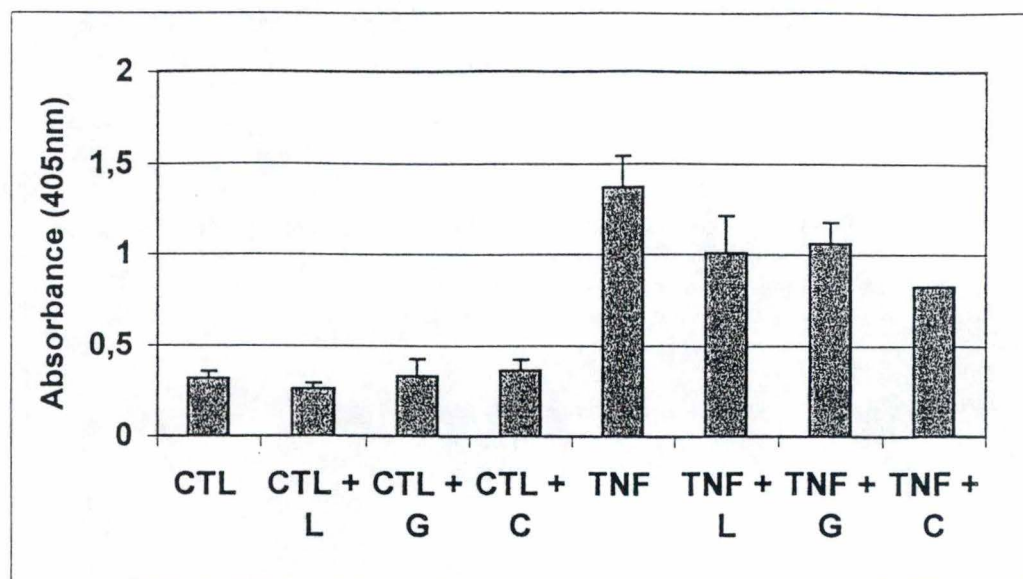


Figure 29 : **Effet de différentes molécules chimiques sur l'apoptose des cellules L929 (deuxième essai).**

CTL : cellules L929 incubées 18 heures avec milieu DHG + 0,5% de sérum.

CTL + L : CTL + lactacystine à une cc finale de 10 $\mu$ M.

CTL + G : CTL + geldanamycine à une cc finale de 2nM.

CTL + C : CTL + chlorure de cobalt à une cc finale de 150  $\mu$ M.

TNF : CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml)

TNF + L : TNF + lactacystine à une cc finale de 10 $\mu$ M.

TNF + G : TNF + geldanamycine à une cc finale de 2nM.

TNF + C : TNF + chlorure de cobalt à une cc finale de 150 $\mu$ .

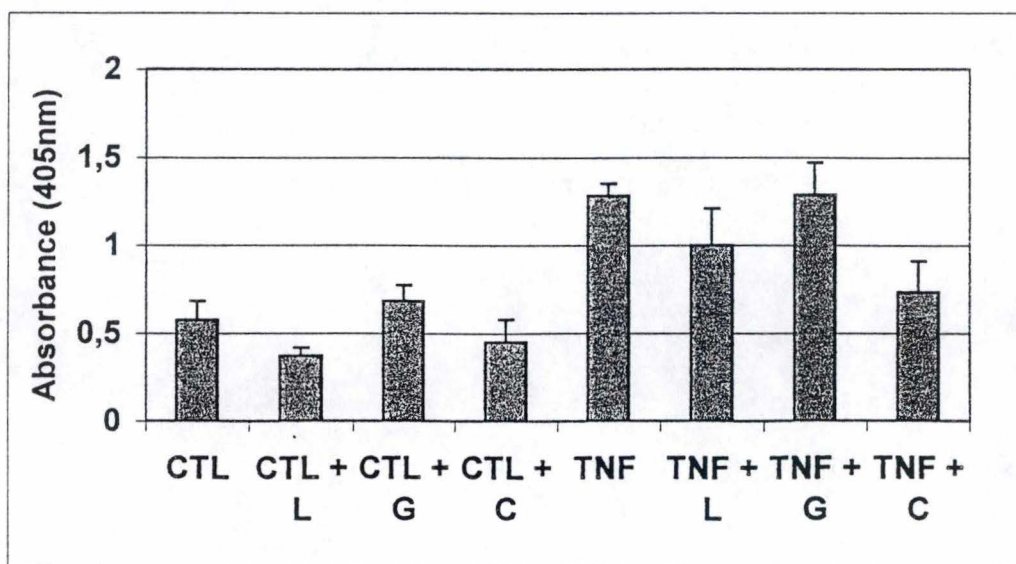


Figure 31: **Effet de différentes molécules chimiques sur l'apoptose des cellules COS-7.**

CTL : cellules COS-7 incubées 18 heures avec milieu cos + 0,5% de sérum.

CTL + L : CTL + lactacystine à une cc finale de 10  $\mu$ M.

CTL + G : CTL + geldanamycine à une cc finale de 2nM.

CTL + C : CTL + chlorure de cobalt à une cc finale de 150 $\mu$ M.

TNF : CTL + TNF- $\alpha$  (5ng/ml)

TNF + L : TNF + lactacystine à une cc finale de 10 $\mu$ M.

TNF + G : TNF + geldanamycine à une cc finale de 2nM.

TNF + C : TNF + chlorure de cobalt à une cc finale de 150 $\mu$ M.



l'apoptose. Cette diminution est également observée en présence de chlorure de cobalt. Ces deux molécules conduisent à l'activation de HIF-1.

Par contre, quand on ajoute de la geldanamycine au milieu des cellules COS-7 en plus du TNF- $\alpha$ , on n'observe pas de diminution ou d'augmentation du niveau d'apoptose induit par le TNF- $\alpha$ . Il faut remarquer qu'on observe des effets similaires, c'est-à-dire une diminution de la fragmentation de l'ADN en présence de molécules activatrices de HIF-1 et pas d'effet de la geldanamycine, molécule qui inhibe l'activation de HIF-1, sur le taux basal d'apoptose des cellules COS-7.

Ces résultats suggèrent que l'induction de l'expression ou l'activation de HIF-1 chez les cellules COS-7 et L929 induirait une diminution de l'apoptose cellulaire tandis que son inhibition n'a pas d'effet.

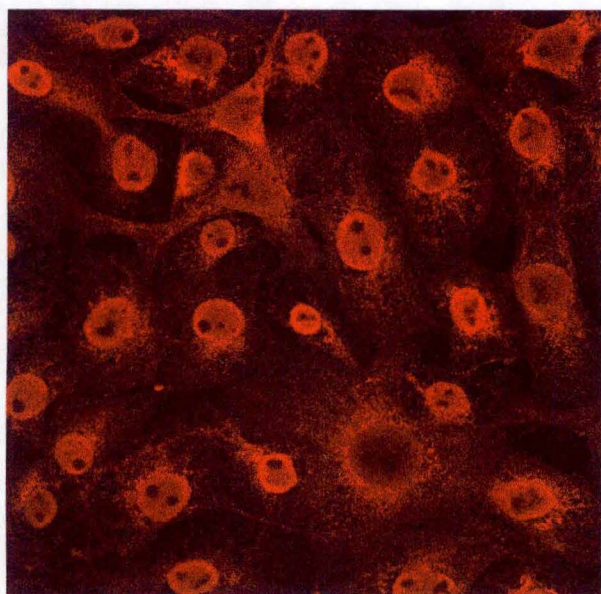
#### 4) Expériences d'immunofluorescence

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons déterminé la localisation subcellulaire de la protéine Bax, une molécule inductrice de l'apoptose, par la technique d'immunofluorescence. Chez les cellules COS-7, on retrouve Bax dans les mitochondries des cellules contrôles et des cellules en normoxie tandis que chez les cellules en hypoxie ou les cellules incubées au TNF- $\alpha$ , Bax est transloquée dans le noyau de ces cellules. Ici aussi, on pourrait parler d'un gradient qui existe quant à la translocation de Bax : Bax serait d'abord transloquée dans les mitochondries puis si l'effet de la molécule qui induit cette translocation persiste, on assisterait à la translocation de Bax dans le noyau.

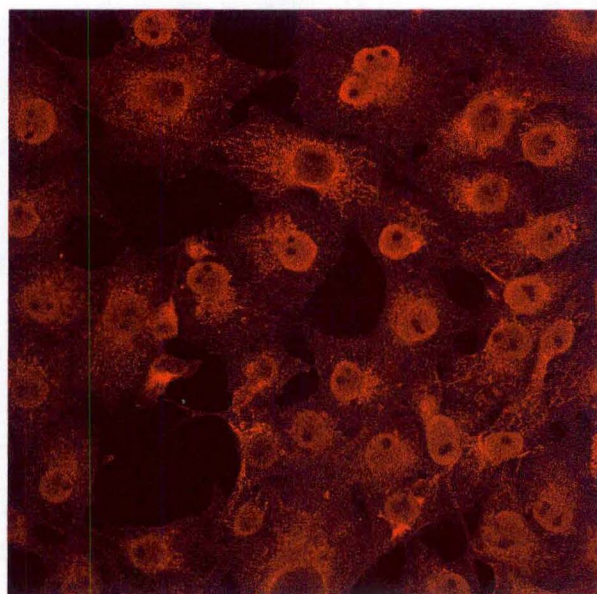
En ce qui concerne les cellules L929, nous avons pu seulement mettre en évidence la présence de la protéine Bax dans le cytoplasme de celles-ci mais aucune translocation mitochondriale ou nucléaire n'a été observée quelles que soient les conditions expérimentales.

Afin de vérifier si HIF-1 peut moduler cette translocation, nous avons recommencé cette expérience en ajoutant des molécules chimiques qui activent ou inhibent le facteur de transcription HIF-1. Seules les cellules COS-7 chez qui nous

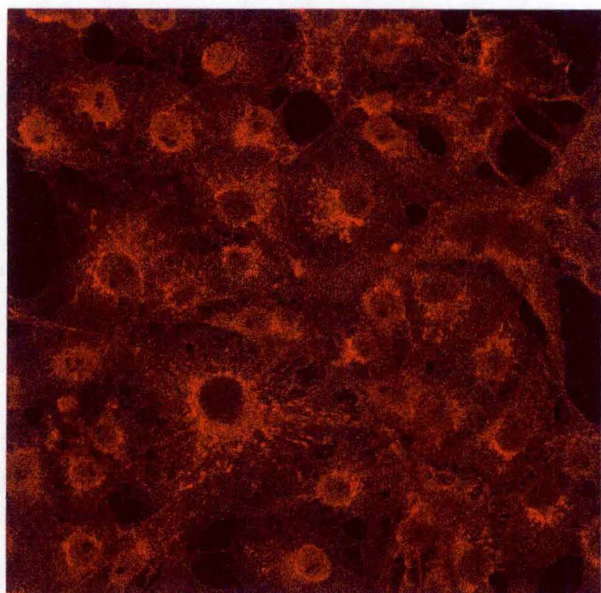




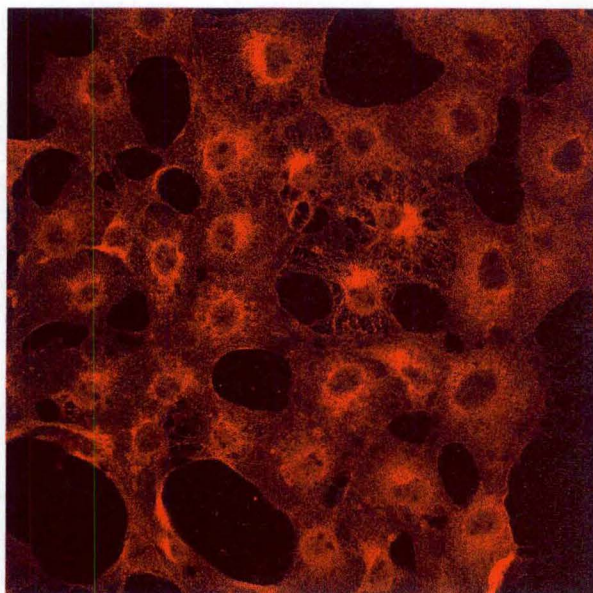
**Cellules COS-7 en normoxie**



**Cellules COS-7 en normoxie  
+ lactacystine**



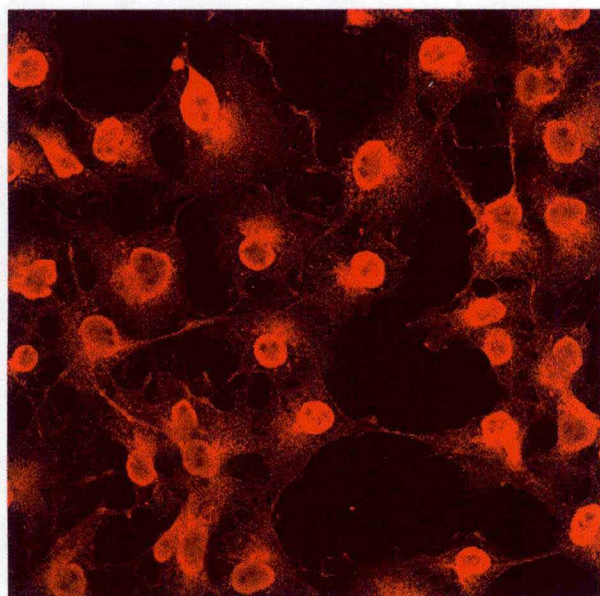
**Cellules COS-7 en normoxie  
+ geldanamycine**



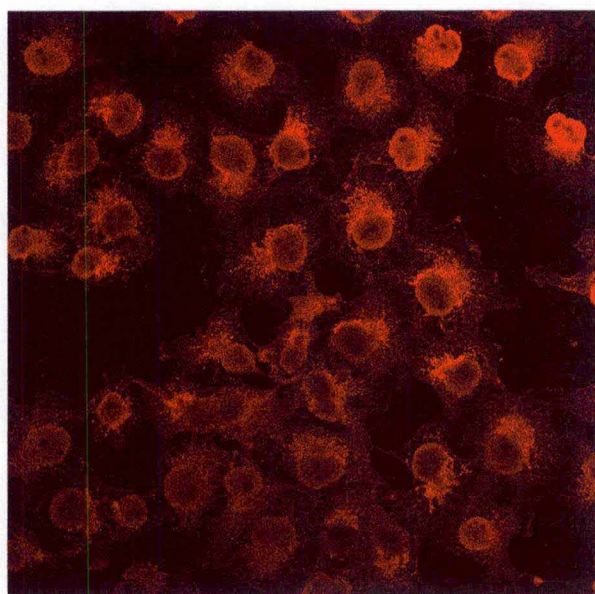
**Cellules COS-7 en normoxie  
+ CoCl<sub>2</sub>**

Figure 32 : Effets de différentes molécules chimiques sur la localisation subcellulaire de Bax chez les cellules COS-7 en normoxie (grossissement 40 X).

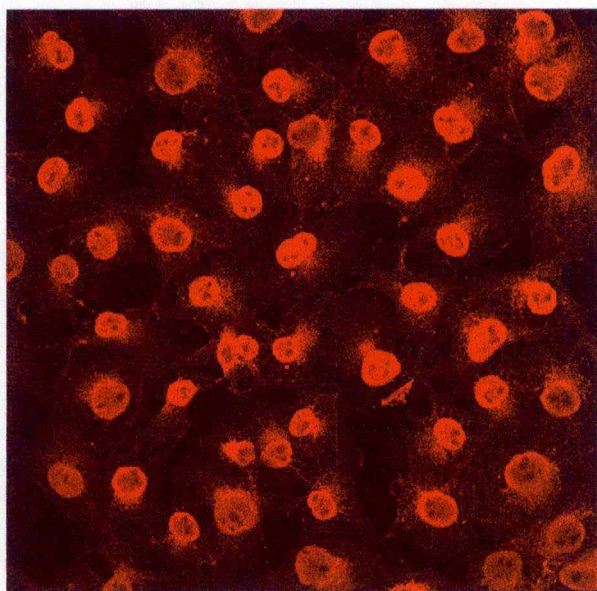




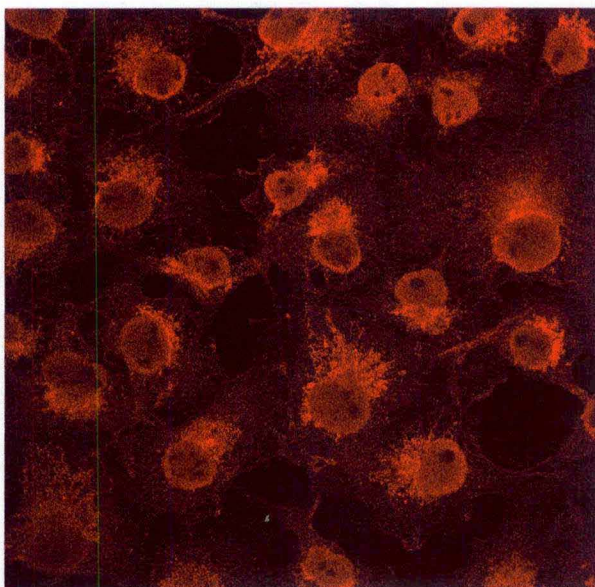
**Cellules COS-7 en hypoxie**



**Cellules COS-7 en hypoxie  
+ Lactacystine**



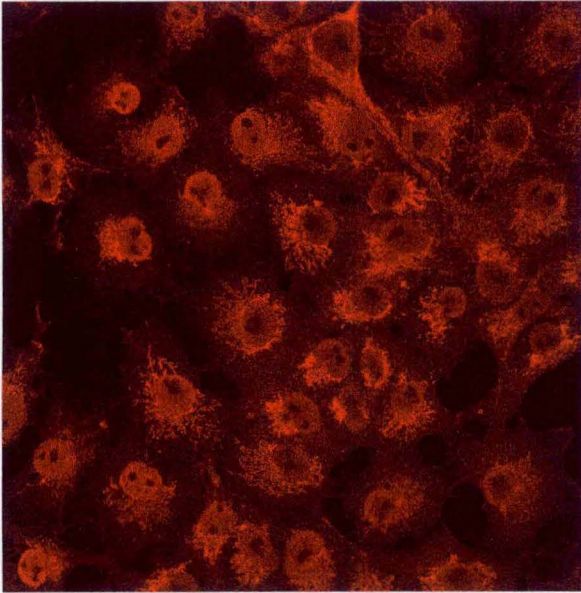
**Cellules COS-7 en hypoxie  
+ Geldanamycine**



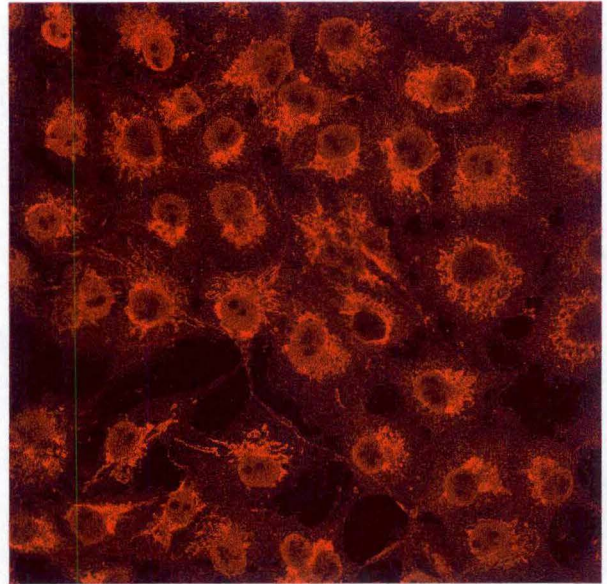
**Cellules COS-7 en hypoxie  
+ CoCl<sub>2</sub>**

**Figure 33 : Effets de différentes molécules chimiques sur la localisation subcellulaire de Bax chez les cellules COS-7 en hypoxie (grossissement 40 X).**

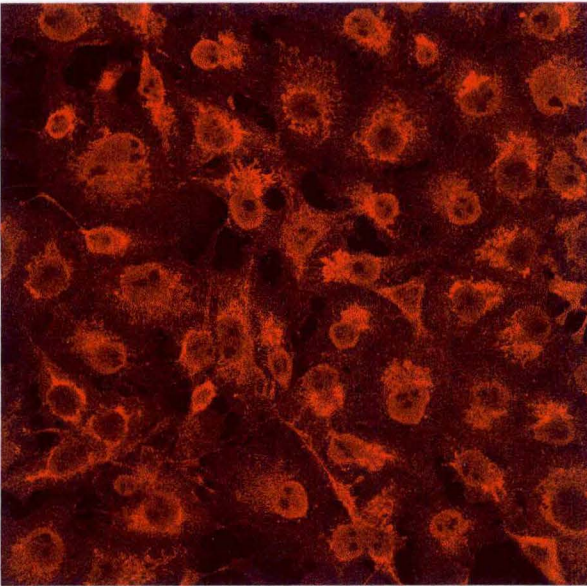




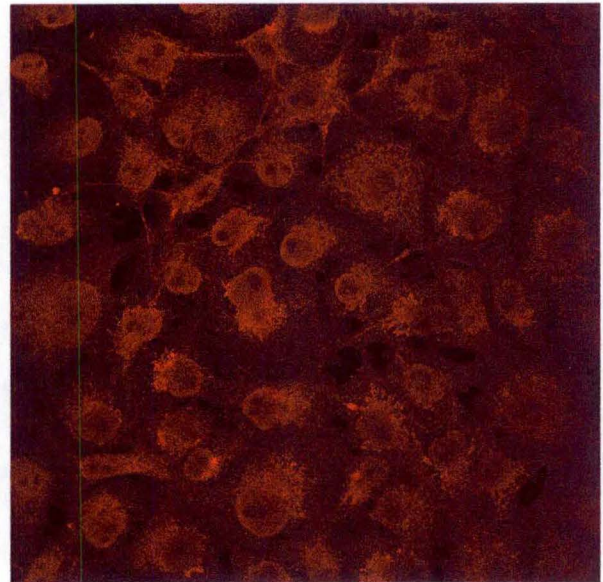
**Cellules COS-7 CTL**



**Cellules COS-7 CTL  
+ Lactacystine**



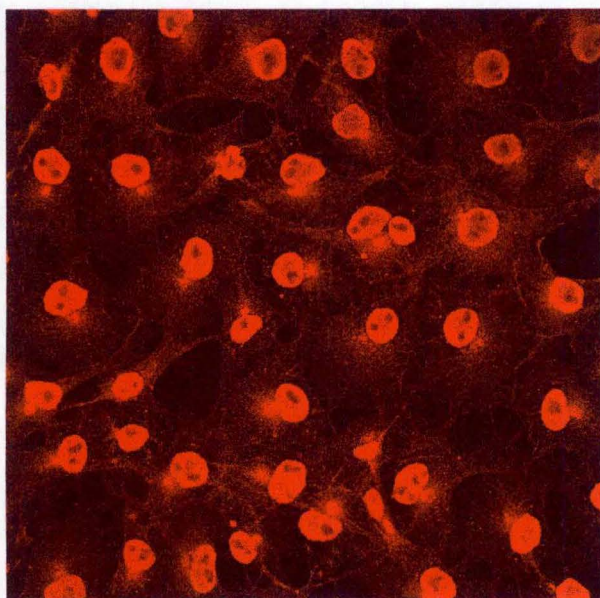
**Cellules COS-7 CTL  
+ Geldanamycine**



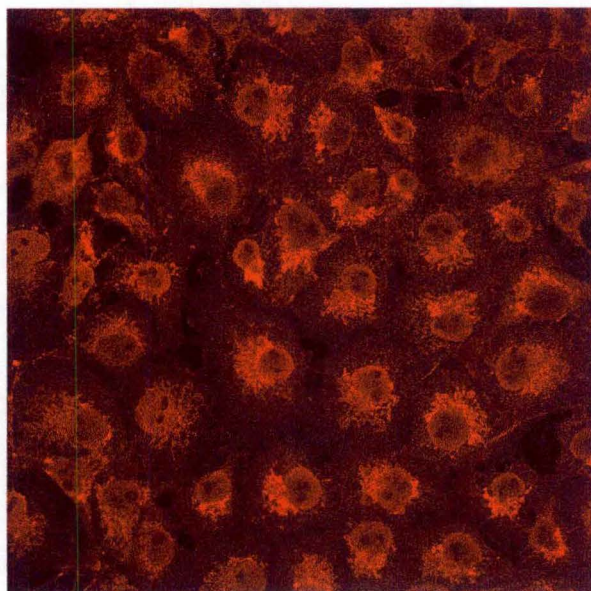
**Cellules COS-7 CTL  
+ CoCl<sub>2</sub>**

**Figure 34 : Effets de différentes molécules chimiques sur la localisation subcellulaire de Bax dans les cellules COS-7 contrôles (grossissement 40 X).**

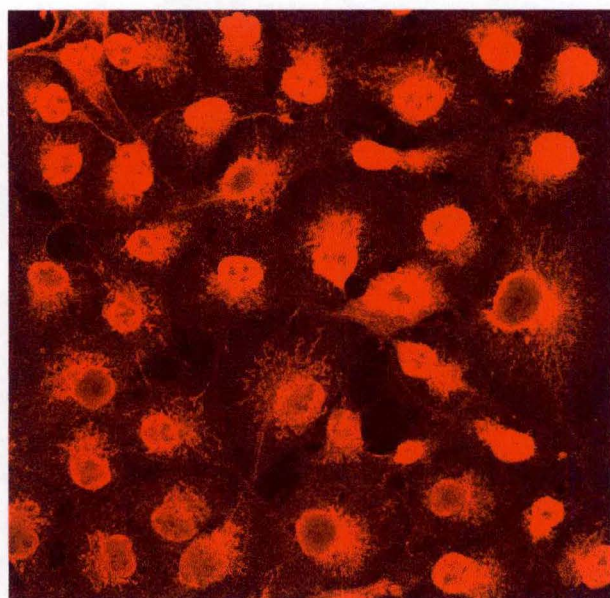




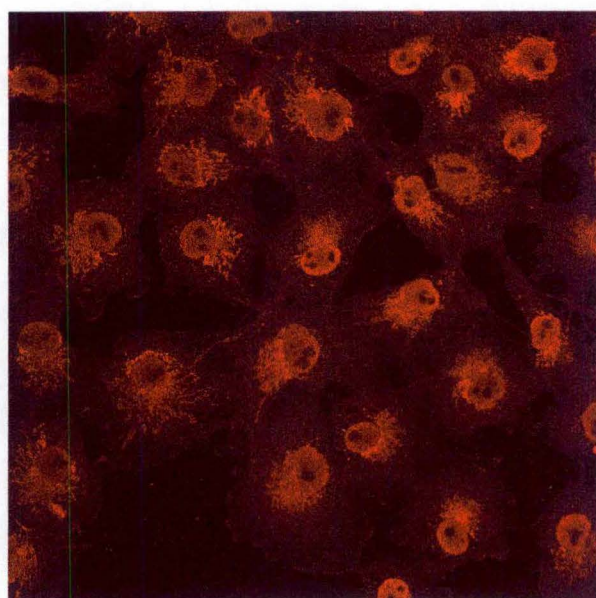
**Cellules COS-7 + TNF- $\alpha$**



**Cellules COS-7 + TNF- $\alpha$   
+ Lactacystine**



**Cellules COS-7 + TNF- $\alpha$   
+ Geldanamycine**



**Cellules COS-7 + TNF- $\alpha$   
+ CoCl<sub>2</sub>**

Figure 35 : Effets de différentes molécules chimiques sur la localisation subcellulaire de Bax chez les cellules COS-7 incubées en présence de TNF- $\alpha$  (grossissement 40 X).



avons observé la translocation nucléaire ont été utilisées. Les molécules activatrices sont la lactacystine utilisée à une concentration finale de 100nM et le chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>) à une concentration de 150 µM. D'autre part, pour inhiber l'activation de HIF-1, nous avons utilisé la geldanamycine à une concentration finale de 2nM. Ces molécules ont été ajoutées au milieu des cellules COS-7 juste avant leur incubation sous hypoxie ou en normoxie pendant 8 heures ou juste avant leur incubation de 18 heures en présence ou en absence de TNF-α.

## Résultats

### 1) Hypoxie et normoxie (Figures 32 et 33)

Après observation des cellules au microscope confocal, on peut voir que les cellules en normoxie montrent une localisation de Bax dans les mitochondries comme on l'avait observé précédemment. Cette localisation mitochondriale est aussi observée pour les cellules en normoxie auxquelles on a ajouté la lactacystine, la geldanamycine ou le chlorure de cobalt.

Quant aux cellules en hypoxie, on observe de nouveau une translocation nucléaire de Bax. Si on ajoute la lactacystine au milieu des cellules en hypoxie, la translocation nucléaire de la protéine Bax est inhibée et cette protéine reste dans les mitochondries. Ce phénomène est aussi observé quand on ajoute le chlorure de cobalt dans le milieu des cellules. Par contre, la geldanamycine n'a pas d'effet sur la translocation nucléaire de Bax induite par l'hypoxie.

### 2) Cellules contrôles et cellules incubées avec TNF-α (Figures 34 et 35)

## Résultats

Pour les cellules contrôles, on observe comme précédemment la présence de Bax dans les mitochondries. Si les différentes molécules chimiques activatrices et inhibitrice de l'expression de HIF-1 sont ajoutées au milieu des cellules, aucun changement de localisation n'est observé, on retrouve toujours Bax dans les mitochondries.



Par contre pour les cellules COS-7 incubées en présence de TNF- $\alpha$ , on observe à nouveau comme lors de la première expérience la translocation de Bax dans le noyau de ces cellules.

Si la lactacystine ou le chlorure de cobalt sont ajoutés en plus du TNF- $\alpha$ , on observe, comme pour les cellules en hypoxie, une inhibition de la translocation de Bax des mitochondries vers le noyau et Bax reste dans les mitochondries. Par contre, si on ajoute la geldanamycine en plus du TNF- $\alpha$  dans le milieu des cellules, on ne modifie pas la translocation nucléaire de Bax induite par le TNF- $\alpha$ .

### Discussion

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une augmentation de l'activité de HIF-1 conduit à une inhibition de l'apoptose qu'elle soit induite par l'hypoxie ou par le TNF- $\alpha$ . Cette inhibition de l'apoptose se marque au niveau de l'induction de la fragmentation de l'ADN dans les cellules L929 et COS-7 et au niveau de la translocation de Bax des mitochondries vers le noyau dans les cellules COS-7.

Dans la littérature, on explique la translocation de Bax par l'intermédiaire de la protéine Bid mais on ne connaît pas encore tout le mécanisme mis en jeu. Bid serait un des substrats de la caspase 8 lors de l'apoptose. Ainsi, Bid qui est présente dans le cytosol en tant que protéine inactive est clivée par cette caspase. Le fragment p15 qui résulte de ce clivage se transloque dans la membrane des mitochondries, induit l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale externe et ainsi, la libération du cytochrome c. Comme Bid ne possède pas de signal transmembranaire qui permettrait son ancrage dans la membrane, Bid pourrait se lier à la membrane mitochondriale via un récepteur ou via une liaison avec des protéines membres de la famille Bcl-2 (Bossy-Wezel & Green, 1999). D'autre part, il se peut que la migration de Bax vers la mitochondrie fasse intervenir un autre mécanisme que la protéine Bid, mécanisme encore inconnu. Quant à la translocation de Bax dans le noyau, rien n'est encore décrit à ce propos.

**Conclusion  
et  
Perspectives**



## IV. Conclusion et Perspectives

Le rôle du facteur de transcription HIF-1 en conditions d'hypoxie est bien décrit dans la littérature ; en effet, il possède comme cibles les gènes codant pour l'érythropoïétine, le VEGF et des enzymes glycolytiques qui favorisent la survie de la cellule quand elle est soumise à une hypoxie. Cependant, l'hypoxie peut également induire la mort des cellules par apoptose et paradoxalement HIF-1 serait également impliqué dans ce processus. En effet, les travaux de Carmeliet *et al* (1998) montrent que des tumeurs de cellules souches embryonnaires HIF-1 $\alpha$  -/- croissent mieux que les contrôles HIF-1 $\alpha$  +/+ et ce, parce que le taux d'apoptose est diminué. Le mécanisme par lequel HIF-1 favorise l'apoptose pourrait impliquer la stabilisation de p53, protéine pro-apoptotique, par HIF-1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie.

Différentes questions sont soulevées par ces résultats :

- Est-ce que HIF-1 contrôle l'apoptose dans d'autres types cellulaires que chez les cellules souches embryonnaires ?
- Est-ce qu'il module l'apoptose induite par l'hypoxie mais aussi par d'autres stimuli ?
- Est-ce que la stabilisation de p53 par HIF-1 $\alpha$  est le seul mécanisme par lequel HIF-1 module l'apoptose ?

Pour répondre à ces questions nous avons tout d'abord mis au point des conditions expérimentales qui nous ont permis d'induire de l'apoptose par hypoxie. Nous avons dès lors pu observer une induction de l'apoptose plus importante chez les cellules COS-7 que celle observée chez les cellules L929. Ce phénomène d'induction de l'apoptose par l'hypoxie est aussi décrit dans les travaux de Hiroshi & Mehta (1999) qui ont travaillé sur des cardiomyocytes de rats et dans les travaux de Li *et al* (1998) qui eux, ont travaillé sur des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine. Cependant, il est difficile de mettre ce phénomène en évidence car nous avons observé au cours des expériences que l'apoptose induite par l'hypoxie ne touche qu'un faible pourcentage de la population totale c'est-à-dire environ 5 à 10 %.

Par ailleurs, nous avons étudié en parallèle l'effet du TNF- $\alpha$  sur l'apoptose cellulaire chez les deux types cellulaires COS-7 et L929. Après avoir incubé les cellules pendant une durée de 18 heures en présence de TNF- $\alpha$  à une concentration finale de 5 ng/ml, nous avons pu observer que le TNF- $\alpha$  induit plus fortement l'apoptose que lorsque les cellules sont incubées en hypoxie. Ce phénomène est surtout observable chez les cellules L929.

D'autre part, nous avons étudié, dans ces conditions expérimentales, l'expression et la localisation de deux protéines pro-apoptotiques : Bax et p53.

Nous avons pu observer chez les cellules COS-7 et les cellules L929 la localisation nucléaire de p53 que les cellules soient incubées en hypoxie ou en présence de TNF- $\alpha$ . Par contre, l'expression de p53 ne varie pas et ce malgré les différentes conditions imposées.

En ce qui concerne la protéine Bax, sa localisation subcellulaire ne varie pas chez les cellules L929 en fonction des conditions expérimentales imposées, on la retrouve toujours dans le cytoplasme de ces cellules. Par contre, chez les cellules COS-7, nous avons pu mettre en évidence la translocation de Bax dans les mitochondries et dans le noyau lorsque ces cellules sont incubées en hypoxie et en présence de TNF- $\alpha$  alors que les cellules maintenues en hypoxie montrent une localisation subcellulaire de Bax dans le cytoplasme. Cependant, cette translocation se passe sans changement d'expression.

La translocation de Bax dans les mitochondries lorsque l'on induit l'apoptose est bien décrite dans la littérature. Par contre, on ne retrouve aucune information quant à la translocation de Bax dans le noyau des cellules. On peut donc à ce niveau proposer deux hypothèses pour expliquer ce phénomène. Dans un premier modèle, on proposerait que cette protéine Bax est d'abord transloquée dans les mitochondries des cellules puis dans un second temps on observerait une translocation de Bax dans le noyau si le signal apoptotique est plus fort. En somme, il existerait une sorte de gradient quant à la translocation de Bax. D'autre part, on pourrait proposer dans un second modèle que l'hypoxie imposée aux cellules induirait un mécanisme différent de celui mis en oeuvre dans les processus apoptotiques « classiques » et qui provoquerait la translocation de Bax dans le noyau.



Si on peut observer une augmentation de l'apoptose lorsque les cellules sont soumises à des conditions d'hypoxie, on ne connaît cependant pas la voie de transduction du signal qui conduit ces cellules à entrer en apoptose. Dans le but de pouvoir donner des informations à ce sujet, nous avons réalisé des expériences afin de montrer si le facteur de transcription HIF-1 pouvait être impliqué dans ce mécanisme d'induction de l'apoptose.

Deux approches ont été envisagées. Nous avons dans un premier temps essayé de surexprimer HIF-1 dans des expériences de transfection transitoire. Cependant, nous n'avons pu tirer aucune conclusion quant à l'effet du facteur HIF-1 sur l'apoptose cellulaire car le stress que provoquait la transfection par elle-même engendre un taux basal d'apoptose important chez les deux types cellulaires, si bien que l'apoptose induite n'est plus visible.

Au cours de la deuxième approche, nous avons tenté d'activer ou d'inhiber HIF-1 en utilisant cette fois des molécules chimiques. Pour activer ce facteur de transcription, nous avons utilisé la lactacystine et le chlorure de cobalt tandis que pour induire son inhibition, nous avons utilisé la geldanamycine. Nous avons pu observer au cours de ces expériences, que lorsque HIF-1 était activé, on remarque une diminution de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ . Ce phénomène a été observé dans les deux types cellulaires étudiés. Non seulement, on observe, lorsque HIF-1 est activé, une diminution de l'apoptose quand celle-ci est induite par le TNF- $\alpha$ , mais on peut aussi observer une diminution du taux basal de l'apoptose.

Ces résultats observés au cours de ces expériences sont en contradiction avec les résultats que l'on peut retrouver dans la littérature. En effet, lorsque des conditions d'hypoxie sont imposées aux cellules, on observe une augmentation de la quantité de protéine HIF-1 $\alpha$  dans ces cellules qui provoque la stabilisation de p53 et induit chez ces cellules le phénomène d'apoptose (Minet *et al*, 1999d). Des expériences de coimmunoprécipitation ont pu, en effet, mettre en évidence l'interaction de HIF-1 $\alpha$  et de p53 (An *et al*, 1998). Cette interaction favorise la stabilité de p53 qui peut alors jouer son rôle de protéine pro-apoptotique et donc induire l'apoptose.

Dans les conditions expérimentales utilisées au cours de ce travail, nous n'avons pas mis en évidence un changement dans l'expression ou dans la localisation de p53 dans

des conditions d'hypoxie alors que ces conditions conduisent effectivement à une accumulation de la protéine HIF-1 $\alpha$ . Il se pourrait donc que le mécanisme mis en jeu par HIF-1 pour inhiber l'apoptose cellulaire dans ce cas soit tout autre. Les conditions d'hypoxie que nous imposons aux cellules ne sont pas assez sévères que pour induire la stabilisation de p53 et donc l'apoptose cellulaire médiée par celle-ci. Dans la littérature, on retrouve plutôt ce phénomène lorsque des conditions d'anoxie c'est-à-dire 0% d'O<sub>2</sub> sont imposées aux cellules (Graeber *et al*, 1994).

Quel pourrait être le mécanisme par lequel HIF-1 protégerait contre l'apoptose ? On sait que HIF-1 $\alpha$  joue un rôle dans l'adaptation des cellules lorsque celles-ci sont soumises à l'hypoxie. Il induit la transcription de certains gènes comme le gène codant pour l'érythropoïétine, le VEGF et différents enzymes glycolytiques qui permettent à la cellule de maintenir pendant quelques temps son niveau d'ATP. Il permet donc la survie des cellules, du moins si le temps d'hypoxie n'est pas prolongé indéfiniment. On peut également trouver dans la littérature des résultats montrant que lorsque des cellules surexprimant GLUT-1, un transporteur de glucose, on observe une diminution de l'apoptose cellulaire induite par l'hypoxie par rapport aux cellules ne surexprimant pas ce transporteur (Lin *et al*, 2000). GLUT-1 est un gène cible de HIF-1 dont la transcription est augmentée en hypoxie (Wood *et al*, 1998). On pourrait donc envisager une voie dans laquelle HIF-1, activé par l'hypoxie, provoque une augmentation de l'expression de GLUT-1 qui lui protège les cellules de l'apoptose induite par hypoxie par une voie encore inconnue. Le mécanisme de la protection offerte par HIF-1 contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  est encore plus mystérieux.

Enfin, nous avons pu observer que la protéine Bax est transloquée dans les mitochondries et le noyau lorsque les cellules sont incubées en hypoxie ou en présence de TNF- $\alpha$ , et que cette translocation est inhibée lorsque HIF-1 est activé. Ce phénomène est observable uniquement chez les cellules COS-7. Ces observations suggèrent qu'il puisse exister une relation entre HIF-1 et la protéine Bax. Pris ensemble, ces résultats montrent que HIF-1 peut inhiber différents processus induits lorsqu'une cellule meurt par apoptose. Cependant le mécanisme mis en oeuvre reste à ce jour inconnu. Ces nouveaux résultats proposant un rôle protecteur de HIF-1 en diminuant l'apoptose cellulaire induite ouvrent de nouvelles perspectives inattendues



qui pourraient s'avérer très intéressants dans la protection des cellules dans certaines maladies dégénératives.

# **Bibliographie**



**W.G. An, M. Kanekal, M.C. Simon, E. Maltepe, M.V. Blagosklonny, L.M. Neckers.**  
Stabilisation of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ .  
*Nature* 392 (1998) 405-408.

**Apoptosis and cell proliferation (2<sup>nd</sup> edition).**  
Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica (1998).

**M.V. Blagosklonny, W.G. An, L.Y. Romanova, J. Trepel, T. Fojo and L. Neckers.**  
p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription.  
*J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11995-11998.

**E. Bossy-Wetzel and D. G. Green.**  
Apoptosis : checkpoint at the mitochondrial frontier.  
*Mutation Research* 434 (1999) 243-251.

**R. Carmeliet, Y. Dor, J.-M. Herbert, D. Fukumara, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C.J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R.K. Jain, D. Collen and E. Keshet.**  
Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis.  
*Nature* 394 (1998) 485-490.

**V. Goossens, K. De Vos, D. Vercammen, M. Steemans, K. Vancompernelle, W. Fiers, P. Vandenabeele, J. Grooten.**  
Role of reactive oxygen species in tumor necrosis factor toxicity.  
Academic Press (Antioxidant and Redox Regulation of Genes) 2000.

**K. Gradin, J. McGuire, R.H. Wenger, I. Kvietikova, M.L. Whitelaw, R. Toftard, R.L. Tora, M. Gassmann, L. Poellinger.**  
Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathway competition for recruitment of the Arnt transcription factor.  
*Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 5221-5231.

**T.G. Graeber, J.-F. Peterson, M. Tsai, K. Monica, A.J. Jr Fornace, A.J. Giacca.**  
Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is dependent of p53 status.  
*Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 6264-6277.

**D. Green and G. Kroemer.**  
The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria ?  
*Cell. Biol.* 8 (1998) 267-271.

**A. Gross, J.M. Mc Donnell, S.J. Korsmeyer.**  
Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis.  
*Genes & Development* 13 (1999) 1899-1911.

**K. Guillemin, M.A. Krasnow.**  
The hypoxic response : huffing and hifing.  
*Cell* 89 (1997) 9-12.

**M.G.V. Heiden, C.B. Thompson.**

Bcl-2 proteins : regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis ?  
Nat. Cell Biol. 1 (1999) 209-214.

**T.M. Hiroshi, S.Adachi, *et al.***

Hypoxia induced apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured rat cardiomyocytes.  
Circ. Res. 75 (1994) 426-430.

**L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston, H.F. Bunn.**

Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilisation of its  $\alpha$  subunit.  
J. Biol. Chem. 271 (1996) 32253-32259.

**L.E. Huang, J. Gu, M. Schau, H.F. Bunn.**

Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 7987-7992.

**B. H. Jiang, J.Z Zheng, S.W. Leung, R. Roe, G.L. Semenza.**

Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway.  
J. Biol. Chem. 272 (1997) 19253-19260.

**P.J. Kallio, W.J. Wilson, S. O'Brien, Y. Makino, L. Poellinger.**

Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway.  
J. Biol. Chem. 274 (1999) 6519-6525.

**C. Kitanaka, T. Namiki, K. Mochizuki, S. Kagaya, A. Hayashi, A. Asai, Y. Tsuijimoto, Y. Kuchino.**

Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression : differential effects of Bcl-2 and Bcl-xL on Bax-induced caspase activation and apoptosis.  
Oncogene 15 (1997) 1763-1772.

**Y. Kouroku, E. Fujita, A. Jimbo, T. Musaka, T. Tsuru, M.Y. Momoi, T. Momoi.**

Localisation of active form of caspase-8 in mouse L929 cells induced by TNF treatment and polyglutamine aggregates.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 (2000) 972-977.

**A.J. Levine.**

P53, the cellular gatekeeper for growth and division.  
Cell 88 (1997) 323-331.

**D.Li, B.Yang, J.L. Mehta.**

Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances hypoxia-reoxygenation-mediated apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells : critical role of protein kinase C.  
Cardiovascular Research 42 (1998) 805-813.



**Z. Lin, J.M. Weinberg, R. Malhotra, S.E. Merritt, L.B. Holzman, F.C. Brosius III.**  
GLUT-1 reduced hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation.  
*Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278 (2000) 958-966.

**Y. Liu, S. Cox, R. Morita, S. Kourembas.**  
Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells.  
*Circ. Res.* 77 (1995) 638-643

**X. Long, A. Boluyt, B. Lundberg, M. Zheng, J.S. O'Neil, L. Cirelli, C. Lakatta.**  
p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes.  
*J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2635-2643.

**A.Mignon, N.Rouquet, V.Joulin.**  
Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ?  
*Medecine/ Sciences* 14 (1998) 9-17.

**E.Minet, T.Arnoold, G.Michel, I.Roland, G.Michel, M.Raes, J.Remacle, C.Michiels.**  
ERK activation upon hypoxia : involvement in HIF-1 activation.  
*FEBS Lett.* 468 (1999b) 53-58

**E.Minet, I.Ernest, G.Michel, I.Roland, J.Remacle, M.Raes and C.Michiels.**  
HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and *cis* elements located within the 5'UTR.  
*Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 261 (1999a) 534-540.

**E.Minet, G.Michel, J.Remacle and C.Michiels.**  
Role of HIF-1 as transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis.  
*Int. J. of Mol. Med.* 5 (1999d) 0-00.

**E. Minet, D.Mottet, G.Michel, I.Roland, M.Raes, J.Remacle, C. Michiels.**  
Hypoxia-induced activation of HIF-1 : role of HIF-1 $\alpha$ -Hsp90 interaction.  
*FEBS Lett.* 460 (1999c) 251-256.

**S.Nagata.**  
Apoptosis by Death Factor.  
*Cell* 88 (1997) 355-365.

**D.W.Nicholson and N.A.Thornberry.**  
Caspases : killer proteases.  
*TIBS* 22 (1997) 299-306.

**Z.N. Oltavai, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer.**  
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.  
*Cell* 4 (1993) 609-619.

**H.E. Ryan, J. Lo, R.S. Johnson.**

HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.  
EMBO J. 17 (1998) 3005-3015.

**G.L.Semenza.**

Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor-1.  
Annual Reviews (1999) 551-579.

**G.L. Semenza, B.H. Jiang, S.W. Leung, R. Passantino, J-P. Concordet, P. Maire, A. Giallongo.**

Hypoxia responsive elements in the aldolase A, enolase 1 and lactate deshydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.  
J. Biol. Chem 271 (1996) 32529-32537.

**A.Stempien-Otero, A.Karsan, C.J.Cornejo, H.Xiang, T.Eunson, R.S.Morrison, M.Kay, R.Winn and J.Harlan.**

Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death.  
J.Biol.Chem. 274 (1998) 8039-8045.

**M. Tamatani, S. Ogawa, M. Tohyama.**

Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death : a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors.  
Brain. Res. Mol. Brain. Res. 58 (1998) 27-39.

**J.C. Trent 2<sup>nd</sup>, D.J. Mc Conkey, S.M. Loughlin, M.T. Harbison, A. Fernandez, H.N. Ananthaswamy.**

Ras signaling in tumor necrosis factor-induced apoptosis.  
EMBO J. 17 (1996) 4497-4505.

**D. Vercammen, P. Vandenabeele, R. Beyaert, W. Declercq, W. Fiers.**

Tumor necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells.  
Cytokine 11 (1997) 801-808.

**P. Villa, S.H. Kaufmann, W.C. Earnshaw.**

Caspases and caspase inhibitors.  
TIBS 22 (1997) 388-393.

**G.L. Wang, B.H. Jiang, G.L. Semenza.**

Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 216 (1995) 669-675.

**G.L. Wang & G.L. Semenza.**

Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.  
J. Biol. Chem. 270 (1995) 1230-1237.



**R.H. Wenger & M. Gassmann.**

Oxygen(es) and the Hypoxia-Inducible Factor-1.

Biol. Chem. 378 (1997) 609-616.

**M. Whitlaw, M. Gottlicher, J-A. Gustafsson, L. Poellinger.**

Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor : co-localisation of ligand and Hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor.

EMBO J. 12 (1996) 4169-4179.

**S.M. Wood, M.S. Wiesener, K.M. Yeates, N. Okada, C.W. Pugh, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe.**

Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha subunit( HIF-1 alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and independent hypoxia-inducible gene expression.

J. Biol. Chem. 14 (1998) 8360-8368.

**J. Zha, H. Harada, E. Yang, J. Jockel, S.J. Korsmeyer.**

Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X.

Cell 87 (1996) 619-628.